Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. Kochsiek

AUSSCHEIDUNG VON ^{14}C-HEXOBARBITAL-METABOLITEN IN GALLE UND URIN BEI VERSUCHSTIEREN MIT BEGINNENDER ANIT-CHOLESTASE

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Rolf Peter Joeres
aus Mönchengladbach

Würzburg, 04.11.1980

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. Kochsiek

AUSSCHEIDUNG VON ^{14}C-HEXOBARBITAL-METABOLITEN IN GALLE UND URIN BEI VERSUCHSTIEREN MIT BEGINNENDER ANIT-CHOLESTASE

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Rolf Peter Joeres
aus Mönchengladbach

Würzburg, 04.11.1980

Referent: Professor Dr. med. E. Richter

Korreferent: Professor Dr. med. H. A. Kühn

Dekan: Professor Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0020

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	Einleitung	1
II	Abkürzungen	10
III	Material	11
IV	Methoden	13
	1. Tierhaltung und Ernährung	13
	2. Auslösung der experimentellen Erkrankung und der Enzyminduktion	13
	3. Operationstechnik und Versuchsdurchführung	13
	4. Bestimmung der Serumwerte	15
	5. Aufarbeitung von Galle und Urin	17
	6. Auswertung der Dünnschichtchromatographie	18
	7. Versuchsmethoden zur Charakterisierung der polaren Metaboliten	20
	8. Statistische Berechnungen	21
V	Methodische Untersuchungen	22
	1. Identifizierung der Metabolite auf der DC-Platte	22
	2. Charakterisierung der polaren Metaboliten	22
VI	Ergebnisse	28
	1. Leberfunktionsproben	28
	2. Gallensäureausscheidung in Galle und Urin und Gallensäurekonzentration im Serum	28
	3. Serumkonzentrationen von Hexobarbital und HB-Metaboliten	29
	4. HB-Metabolitenmuster in Galle und Urin	37
	5. Ausscheidung von HB-Metaboliten in Galle und Urin	39
	6. Prozentualer Anteil polarer und unpolarer HB-Metaboliten an der Ausscheidung in Galle und Urin	39

Seite

7. Absolute Menge polarer und unpolarer HB-Metaboliten in Galle und Urin 40

8. Gesamtausscheidung von HB-Metaboliten 40

VII Diskussion 52

VIII Zusammenfassung 61

IX Literaturverzeichnis 62

I EINLEITUNG

Störbarkeit von Metabolismus und Transport in der Leberzelle

Die Leber, das größte Einzelorgan des Körpers, nimmt eine zentrale Stellung im Intermediärstoffwechsel ein. Einen Teil ihrer Aufgaben stellt die Entgiftung, Inaktivierung und Ausscheidung sowohl körpereigener als auch exogener Substanzen dar. Die Stoffwechselprozesse richten sich zu diesem Zweck auf eine Erhöhung der Polarität der Metabolite, vorwiegend durch oxidative Schritte, und eine Anhebung des Molekulargewichtes durch Konjugatbildung zur Verbesserung der Exkretionsfähigkeit in die Galle.

Bei Lebererkrankungen kann die Ausscheidung gallepflichtiger Substanzen auf verschiedenen Ebenen gestört sein. Eine gesonderte Beeinflussung der Aufnahme in die Leberzelle a), des intrazellulären Transportes b) und Metabolismus c) als auch der Ausscheidung in die Galle d) ist vorstellbar. Hierzu einige exemplarische Beispiele:

a) Vom Menschen ist bekannt, daß zumindest ein Teil der Patienten, die an einem Gilbert-Meulengracht-Syndrom erkrankt sind, eine Störung in der Aufnahme von Bilirubin durch den Hepatozyten aufweist (28). Untersuchungen von SCHARSCHMIDT u. Mitarb. (46) und SCHWENK u. Mitarb. (47) begründen die Annahme eines Einschleusungsmechanismus im Sinne eines erleichterten Transportes für organische Anionen, der einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Bilirubin, Bromsulphthalein und Indocyaningrün üben hier eine gegenseitige, kompetitive Hemmung aus. Untersuchungen über den hemmenden Einfluß von Gallensäuren auf diesen Mechanismus bleiben in ihrem Ergebnis widersprüchlich (33,57), lassen jedoch einen weiteren getrennten Aufnahmemechanismus vermuten.

b) Zwei cytoplasmatische Proteine, Y (Ligandin) und Z, spielen eine wichtige Rolle im intrazellulären Transport der Leber. Ihre Fähigkeit, große Mengen organischer Anionen zu binden, scheint sie in die Lage zu versetzen, dem oben genannten Transport eine Richtung zu geben. Darüberhinaus wurde nachgewiesen, daß Ligandin mit der Glutathion-S-Transferase B identisch ist, dem Enzym, das u. a. Bromsulphthalein mit Glutathion konjugiert (19,38).

Substanzen, die eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums hervorrufen, wie Dieldrin, DDT und Phenobarbital, erhöhen den Gehalt an Y- und Z-Protein in der Leberzelle mit der Konsequenz, daß z. B. die Verschwinderate von Bromsulphthalein aus dem Plasma und seine Anreicherung in der Leber erhöht ist (38). Zustände, die mit einer Verminderung des Y- und Z-Gehaltes der Leberzelle einhergehen, wie Cholestase durch Ethinylöstradiol und CCl_4-Intoxikation, bewirken entsprechend gegensinnige Veränderungen (25,38).

c) Im arzneimittelabbauenden Enzymsystem der mischfunktionellen Oxidasen nimmt das Cytochrom P-450 eine Schlüsselstellung ein. Eine Reihe von Substanzen, wie z. B. Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren, bewirken eine Zunahme des Gehaltes an Cytochrom P-450 in der Leberzelle im Sinne einer Enzyminduktion. Dies hat zur Folge, daß dann Metabolisierung und Ausscheidung von exogenen Substanzen, wie z. B. Dicoumarol, Methadon, Chloramphenicol und Bromsulphthalein gesteigert sind (5,43,50,58). Andererseits sind dihydroxylierte Gallensäuren in der Lage in vitro Cytochrom P-450 kompetitiv zu hemmen und in höheren Konzentrationen zu zerstören (24). Diese Situation ist für eine Cholestase vorstellbar.

d) Weitgehend unklar sind die Vorgänge, die den Transport von Stoffwechselprodukten von ihrem Bildungsort in der Leber in die Galle bewirken. Durch Phenobarbital wird vorwiegend die Gallensäureunabhängige Gallenfraktion erhöht (48). Lithocholsäureinfusion bewirkt bei der Ratte eine Anhebung des Cholesterol/Phospholipid-

verhältnisses in den Grenzmembranen der Gallencanaliculi. Dadurch wird die hydrophobe Zone in der Membran verbreitert und die Wasserpermeabilität herabgesetzt. Es resultiert eine Cholestase (26). Taurocholsäure fördert die Bildung von Gallensäuremicellen und steigert die Ausscheidung von Indocyaningrün mit diesen Micellen. Dehydrocholsäureinfusion hat eine ausgeprägte Cholerese mit nur geringer Micellenbildung zur Folge und fördert bevorzugt die Elimination von Bromsulphthalein im Vergleich zu anderen organischen Anionen (56).

Gallensäuren

Beispielhaft für einen komplexen Stoffwechselzusammenhang ist das Verhalten der Gallensäuren. Einerseits selber Abbauprodukte des Cholesterins, stehen sie andererseits im Dienste der Aufnahme und Ausscheidung von Substanzen im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufes.

Lebern von gesunden Ratten enthalten 70 µg Gallensäuren pro g Leber. Zwei Drittel davon bilden trihydroxylierte GS (β-Muricholsäure 10 %, Cholsäure 60 %). Der Rest sind dihydroxylierte GS mit je 15 % Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure und 5 % Hyodesoxycholsäure. 80 % der Gallensäuren sind nicht konjugiert, 20 % liegen als Taurin- und Glycinkonjugate vor (18,54).

Während nach Gallengangsligatur in der Leber β-Muricholsäure den größten Anteil der trihydroxylierten GS darstellt und die Konzentration der dihydroxylierten GS verdoppelt ist, sind 48 Std. nach ANIT-Gabe außer Cholsäure und β- Muricholsäure zu gleichen Anteilen andere GS nur noch in Spuren nachweisbar (18,44).

Bei Cholestase ist im Vergleich zu normalen Umständen die Sulfatveresterung deutlich erhöht (31). Für den Hamster stellt die renale Elimination von GS-Sulfat-Konjugaten eine Kompensationsmöglichkeit der eingeschränkten Exkretionsmöglichkeit der Leber bei Cholestase dar (13).

Eine besondere Bedeutung kommt den GS durch die Tatsache zu, daß sie in der Lage sind in einem bestimmten Verhältnis zueinander und mit Cholesterin und Phospholipiden Micellen zu bilden. Auf der einen Seite wird hierdurch ihre osmotische Wirkung herabgesetzt, andererseits scheinen die Micellen in der Lage zu sein, organische Anionen an sich zu binden und dadurch ihre Ausscheidung zu steigern (45,56). Nach ihrem enterohepatischen Kreislauf stehen sie als Transportvehikel für diese Aufgabe erneut zur Verfügung (49).

In der vorliegenden Arbeit wird der Metabolismus von Hexobarbital im tierexperimentellen Modell einer Lebererkrankung, der ANIT-Cholestase, betrachtet. Phenobarbital-vorbehandelte Tiere stellen eine zweite Kontrollgruppe dar.

Hexobarbital-Metabolismus

Zur Untersuchung des arzneimittelmetabolisierenden Enzymsystems der Leber findet häufig Hexobarbital Verwendung. Gründe dafür sind ein niedriges Molekulargewicht (236,3), ausreichende Apolarität, schnelle Metabolisierung im Versuchstier und eine leicht zugängliche Ausscheidung der Abbauprodukte im Urin (4).

Seit längerem ist durch Untersuchungen von HOLCOMB u. Mitarb. (21) bekannt, daß als Hauptmetabolite 3'-Hydroxy-HB (19 % der Dosis) und 3'Keto-HB (59 % der Dosis) im Urin ausgeschieden werden. Daneben erscheinen in geringem Umfang HB und Nor-HB (weniger als 1 % der applizierten Dosis). Neuerdings entdeckte VERMEULEN u. Mitarb. (55) den Epoxid-Diol-Pathway für Hexobarbital beim Menschen und bei der Ratte. Danach finden sich im Urin von Versuchstieren weniger als 0,5 % der Dosis 1',2'-Epoxid-HB und 10 % der Dosis 1,5-Dimethylbarbitursäure. Das Diol des HB ist im Urin wegen seiner Labilität nicht nachweisbar (Abb. 1). Insgesamt erscheinen 95 % der Dosis im Urin, nur 4 % werden mit den Faeces ausgeschieden.

Untersuchungen am Menschen ergaben, daß bei Patienten mit akuter

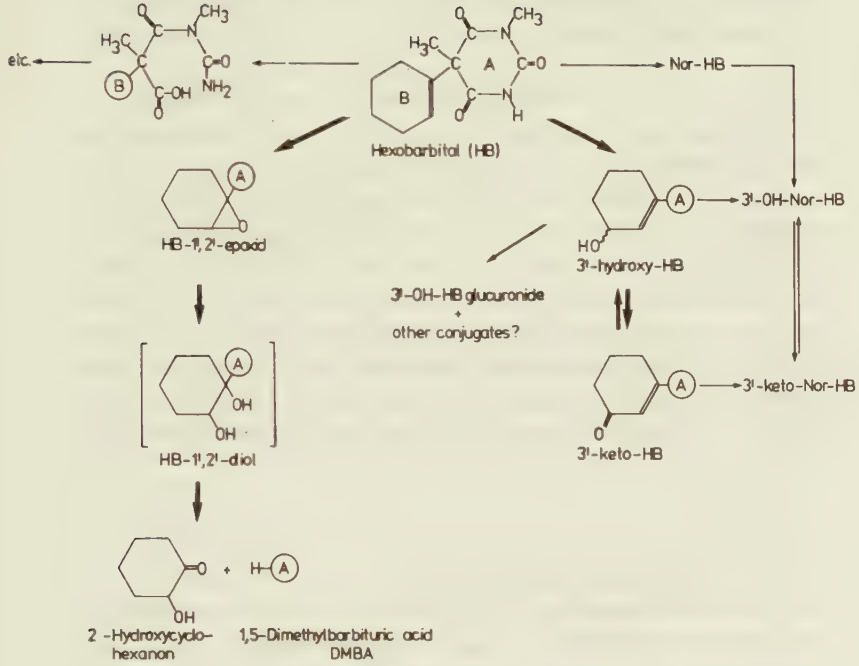

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Hexobarbital (HB)-Metabolismus

Hepatitis und bei Leberzirrhose der HB-Metabolismus eingeschränkt ist, während bei Patienten mit Cholestase keine Veränderung der HB-Pharmakokinetik nachgewiesen werden kann, wohl aber eine ausgeprägte Verminderung des HB-Metaboliten 3'-Keto-HB (40). Bemerkenswerterweise findet sich nach klinischer Erholung von einer akuten Hepatitis weiterhin eine längere Zeit anhaltende Einschränkung des HB-Metabolismus.

Tierversuche mit experimenteller Cholestase durch Gallengangsligatur ergaben zwar eine von Anfang an verlängerte HB-Schlafzeit, zeigten jedoch erst in einem späten Stadium eine Verminderung des HB-Metabolismus (7,9). Zum gleichen Ergebnis gelangen BRACHTEL u. Mitarb. (2) für die intrahepatische Cholestase durch Gabe von ANIT, wobei in vivo keine und in vitro nur geringe Änderungen der HB-Elimination nachweisbar sind. Die Metabolisierung scheint jedoch qualitativ verändert. So findet HEYNEN (20) im Urin von ANIT-behandelten Ratten einen polaren Metaboliten, der bei gesunden Tieren nicht auftritt. Eine Phenobarbital-Vorbehandlung steigert durch Enzyminduktion den HB-Umsatz, ohne das Verhältnis der Metabolite im in vitro-Versuch zu ändern (14).

Enzyminduktion durch Phenobarbital

Wie zahlreiche Untersuchungen ergaben, führt eine Phenobarbitalbehandlung zu einer Stimulierung von Hydroxylierungs-, Glucuronidierungs- und Demethylierungsvorgängen. Daneben ist der Gallefluß erhöht und die Leberdurchblutung gesteigert. Mit unterschiedlicher Betonung beschleunigen diese Faktoren die Elimination einer Reihe exogener Substrate (5,43,50,58).

Elektronenmikroskopische Grundlage dieser Veränderungen ist neben einer Vemehrung der freien Ribosomen im Zytoplasma der Hepatozyten hauptsächlich eine deutliche Zunahme des glatten endoplasmatischen Retikulums, am stärksten ausgeprägt in den Zellen der Läppchenperipherie. Zellkerne, Mitochondrien und rauhes endoplasmatisches

Retikulum erscheinen nicht verändert (1,32).

Einer Erhöhung des Lebergewichtes bei Versuchstieren nach Phenobarbital-Vorbehandlung entspricht eine Zunahme des mikrosomalen Proteingehaltes. Ferner ist die Aktivität der Aminopyrin-Demethylase, der Anilin-Hydroxylase und der Cytochrom-P-450-Gehalt der Leberzelle deutlich erhöht, was gleichbedeutend ist mit einer Zunahme der mischfunktionellen Oxidasen (27,37).

Der Zuwachs an Cytochrom P-450 scheint vornehmlich auf einer gesteigerte Synthese zu beruhen, während die Abbaurate erst in Anpassung an ein erhöhtes Niveau des Hämoproteingehaltes zum Ausgleich ansteigt (17).

Der Grund für den choleretischen Effekt von Phenobarbital liegt wohl nicht in einer Erhöhung der gallensäureabhängigen Gallefraktion. Vielmehr scheint über eine Stimulierung der Na-K-aktivierten ATPase eine Zunahme der gallensäureunabhängigen Fraktion bedingt zu sein (48).

ANIT-Cholestase

Einmalige Gabe von ANIT führt nach lichtmikroskopischen Untersuchungen von ELIAKIM u. Mitarb. (12) und McLEAN und Mitarb. (29) bei Ratten zu entzündlicher Schwellung der Periportalfelder und zu fokalen Nekrosen in den Leberläppchen. Dazu tritt eine Desquamation der Gallengangsepithelien mit Anhäufung von Zelltrümmern in den interlobulären Ductuli auf (16,53). Elektronenoptisch zeigt sich eine Schwellung der Mitochondrien und Brüche in ihrer äußeren Membran. Das endoplasmatische Retikulum ist besonders in seinen glatten Anteilen stark hypertrophiert und zeigt nicht mehr das typische Bild der parallelen Lamellenpaare. In der Hepatozytenmembran treten Defekte auf und in den Gallengangsepithelien finden sich Zeichen der Nekrose (35,44).

Als klinischer Ausdruck der Cholestase kommt es im Blut zu einem Anstieg des Bilirubingehaltes und zu einem Aktivitätsanstieg der GPT, der alkalischen Phosphatase und der Leuzin-Amino-Peptidase, wobei das Maximum dieser Veränderungen nach ca. 72 Std. überschritten wird und die alkalische Phosphatase als Leitenzym betrachtet werden kann (8,39). 12 Std. nach ANIT-Gabe beginnt der Gallefluß deutlich abzunehmen, um weitere 12 Stunden später fast völlig zu versiegen. Gleichsinnige Veränderungen gelten für den Gallensekretionsdruck (6,8).

Die Vorgänge, die nach Gabe von ANIT zu den beschriebenen Veränderungen führen, sind keineswegs aufgeklärt. ANIT wird in der Leberzelle durch das System der mischfunktionellen Oxidase in einen reagiblen Metaboliten umgewandelt, dessen Toxizität in einer hohen Affinität zu microsomalem Leberprotein bestehen könnte (10,41). Möglicherweise werden hierdurch Enzymsysteme betroffen, die u. a. die Gallensäurebildung gewährleisten, wodurch Gallensäuren entstehen könnten, die keine regulären Micellen bilden und somit einen normalen Gallefluß unmöglich machen (18,36).

Die Hyperbilirubinämie hat anscheinend mehrere konkurrierende Ursachen:

1. Leberzellschaden mit Abbau von Hämoprotein,
2. Regurgitation von Galle durch zerstörte Ductuli,
3. Hämolyse,
4. verminderte Aufnahme von Bilirubin durch die Leberzelle (34,42,44).

Diese Vorgänge scheinen geeignet, die Cholestase im Sinne eines Circulus vitiosus weiterhin zu verstärken.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit lautet:

1. Wie sieht das Verteilungsmuster von HB-Metaboliten bei Versuchstieren in Galle und Urin aus?

2. Wie ist die Ausscheidung in den Versuchsgruppen quantitativ verändert?

3. Werden bei ANIT-Cholestase oder nach Phenobarbitalvorbehandlung andersartige Metabolite gebildet?

4. Gibt es bei ANIT-Cholestase eine alternative renale Ausscheidungsmöglichkeit von Metaboliten, die sonst in die Galle ausgeschieden werden?

II ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ANIT	Alpha-Naphtyl-Isothiocyanat
AP	Alkalische Phosphatase
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DC	Dünnschichtchromatographie
% Dosis	% der applizierten Dosis
E	Extinktion
G	Gallefraktion
GCH	Glykocholsäure
GCHDCH	Glykochenodesoxycholsäure
Ges. E.	Gesamt-Eiweiß
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GS	Gallensäure
HB	Hexobarbital
KG	Körpergewicht
µ	mikro (= 10^{-6})
n	Anzahl der Tiere pro Kollektiv
n.s.	nicht signifikant, $p > 0{,}05$
PHENO	Phenobarbital
Tab.	Tabelle
Upm	Umdrehungen pro Minute

III MATERIAL

Versuchstiere:

Männliche Ratten vom Stamm FW 49 (Fa. Thomae, Biberach/Riss)

Substanzen:

Äthanol p.a.	Carl Roth KG, Karlsruhe
Äther p.a.	E. Merck, AG, Darmstadt
Ammoniaklösung p.a.	"
ANIT	EGA-Chemie, Steinheim
^{14}C-Hexobarbital	NEC-653 Cyclohexenyl-3,5-Dimethylbarbitursäure, New England Nuclear, Boston/Mass.
Furosemid	Lasix^{R},Hoechst AG, Frankfurt/M.
HCl, 1n	E. Merck AG, Darmstadt
Hexobarbital	Bayer, Leverkusen
Monitrol	DADE Division, American Hospital Supply Corporation
Olivenöl	Siegfried, Zofingen
physiol. NaCl-Lösung	Fresenius, Bad Homburg
Propanol p.a.	E. Merck, AG, Darmstadt
Ringerlösung	nach DAB 7
Szintigel	Carl Roth KG, Karlsruhe
Trockenfutter	Altromin GmbH, Lage/Lippe

Testansätze:

Testansätze der Fa. C.F. Boehringer & Söhne, Mannheim

Bilirubin	Nr. 15 944
GPT	Nr. 15 956
AP	Nr. 15 987

Gallensäurebestimmung:

Glycocholic Acid RIA-Kit	Fa. Nordiclab,
Glycochenodesoxycholic Acid RIA-Kit	Oulu/Finnland

Biuretreagenz	Kalium-Natrium-Tartrat, 0,2 n NaOH, $CuSO_4 \times 5H_2O$, Kaliumjodid

Geräte:

Infusionspumpe	Unita I, B. Braun, Melsungen
Photometer	Eppendorf Photometer 1101 M, Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Präzisionswaage	A. Sauter KG, Ebingen
Radioaktivitätsmessung	Tri-Carb Scintillations-Spectrometer, Modell 3380, Fa. Packard, Frankfurt/M.
Statistische Berechnungen	Wang Kleincomputer, Modell 700 B, Wang Laboratories GmbH, Frankfurt/M.
Temperaturmeßgerät	NAC Corporation, San Diego/Calif.
Zentrifuge	Typ UJ2, Heraeus Christ GmbH, Osterode
DC-Platten	DC-Fertigplatten SILG-25 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm Kieselgel E. Merck AG, Darmstadt
Katheter	Portex Limited, Hythe/Kent

IV METHODEN

1. Tierhaltung und Tierernährung

Die 225 - 300 g schweren männlichen Ratten des FW 49-Stammes wurden in Käfigen zu fünf Stück gehalten. Sie erhielten Altromin-Standard-Diät und Leitungswasser ad libitum. Konstante Luftfeuchtigkeit, eine Raumtemperatur von 25°C und ein normaler Tag-Nacht-Rhythmus waren gewährleistet.

2. Auslösung der experimentellen Erkrankung und der Enzyminduktion

2.1. ANIT-Cholestase

Die Versuchstiere der Cholestase-Gruppe erhielten 12 Stunden vor dem Versuch mittels Schlundsonde 100 mg ANIT/kg KG, gelöst in 1 ml Olivenöl. Vor der Applikation von ANIT erhielten die Tiere 12 Stunden kein Futter, danach wieder Futter und Wasser ad libitum.

2.2. Phenobarbitalvorbehandlung zur Enzyminduktion

An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurde den Versuchstieren Phenobarbital in nachstehender Dosierung intraperitoneal gespritzt:

50 mg/kg KG, 60 mg/kg KG, 70 mg/kg KG, 80 mg/kg KG, 80 mg/kg KG.

Der eigentliche Versuch fand 48 Stunden nach der letzten Injektion statt.

3. Operationstechnik und Versuchsdurchführung

3.1. Durchführung der Operation

In leichter Äthernarkose wurde das Femoralgefäßbündel in der rechten Leistenbeuge freigelegt. Die Gefäße wurden mobilisiert und zweifach angeschlungen, bevor die Vene von medial zwischen den beiden Schlingen eröffnet wurde. Ein Teflonkatheter ließ

sich dann ca. 3 cm tief einführen. Die Infusion wurde daran angeschlossen und beide Ligaturen zugezogen.

Daraufhin wurde die Bauchhöhle in der Mittellinie vom Processus xiphoideus bis ca. 1 cm vor der Symphyse eröffnet. Den Gallengang eröffneten wir proximal der Mündung der Pankreasausführungsgänge, um einen weichen Teflonkatheter (außen 1 mm Ø) bis zur Leberpforte einzuführen.

Anschließend wurde die Blase, die sich unter der Infusion gefüllt hatte, am Scheitel angeschlungen. Nach schonender Eröffnung der Blase ließ sich ein Katheter einführen. Zwei Ligaturen wurden zur Abdichtung angebracht. Zur Verringerung des Totraumes und zur besseren Führung des Katheters war die Blase nach cranial gestreckt.

Die Dauer der Operation betrug zwischen 20 und 25 Minuten. Nach Eröffnung der Bauchhöhle mußte darauf geachtet werden, daß kein Flüssigkeitsverlust über die serösen Häute und keine Auskühlung eintrat.

3.2. Anordnung und Durchführung des Versuches

Zum Ausgleich von Wärmeverlusten wurden die Tiere während des Versuches aus ca. 75 cm Entfernung mit Rotlicht bestrahlt. Die Temperaturüberwachung erfolgte mit einem elektronischen Thermometer, wobei darauf geachtet wurde, daß die Temperatur nicht unter 35°C sank.

Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde die eröffnete Bauchhöhle mit Zellstoff abgedeckt und nach Bedarf mit Ringerlösung befeuchtet.

Nur durch Infusion einer hypotonen Lösung mit Furosemid war es möglich, eine Urinproduktion in Gang zu bringen.

Zusammensetzung der Lösung:

Ringerlösung	13,5 ml
20 % Glucose	6,5 ml
Aqua pro inj.	20,0 ml
Furosemid	32 mg

Die Infusion erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/h, entsprechend einer Furosemiddosis von 4 mg/h. Verlorene Gallensäuren wurden nicht substituiert.

Nach erfolgter Operation wurde Hexobarbital nach Unterbrechung der Äthernarkose in einer Dosis von 100 mg/kg KG zusammen mit 5 µCi ^{14}C-HB in das Duodenum injiziert. Während 1 h post injectionem wurden in viertelstündlichen Fraktionen Proben von Galle und Urin gesammelt. Zur Bestimmung des Serumspiegels von ^{14}C-HB-Metaboliten wurde am Ende jeder Viertelstunde Blut aus der Schwanzspitze entnommen.

Am Ende des Versuches wurde durch Punktion der Bauchaorta zur Bestimmung der Laborwerte Blut gewonnen.

4. Bestimmung der Serumwerte

Das durch Punktion der Aorta abdominalis gewonnene Blut wurde für 10 Minuten bei ca. 5 000 Upm zentrifugiert und das Serum abpipettiert.

4.1. Proteinbestimmung im Serum

Die Bestimmung des Ges.E. im Serum erfolgte mittels der Biuretreaktion nach untenstehendem Verfahren:

1. Versuchsansatz:	0,1 ml	Serum
	5,0 ml	physiol. NaCl-Lösung
	5,0 ml	Biuret-Reagenz

2. Leerwert:	5,0 ml	physiol. NaCl-Lösung
	5,0 ml	Biuret-Reagenz
3. Standard:	0,1 ml	Monitrol (≙ 7,0 mg Protein)
	5,0 ml	physiol. NaCl-Lösung
	5,0 ml	Biuret-Reagenz

Die Ansätze blieben 30 min bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurde im Eppendorf-Photometer 110/M bei 546 nm die Extinktion bestimmt.

Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Proteingehalt im Serum} = \frac{7{,}0 \times E_{Probe}}{E_{Standard}} \left[\frac{\text{g Protein}}{\text{100 ml Serum}}\right]$$

4.2. Bestimmung des Bilirubingehaltes, der alkalischen Phosphatase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase

Der Bilirubingehalt, die Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase des Serums wurde mit der angegebenen Testkombination der Fa. Boehringer, Mannheim, im Eppendorf-Photometer 110/M bestimmt.

4.3. Bestimmung der Gallensäuren

In Galle, Urin und Serum wurden die Gallensäuren bestimmt, die mit den RIA-Testkits der Fa. Nordiclab, Finnland, wie Glykochol- und Glykochenodesoxycholsäure reagieren.

4.4. Bestimmung des Gehaltes von ^{14}C-HB-Metaboliten im Serum

Das viertelstündlich aus der Schwanzspitze entnommene Blut wurde zentrifugiert und das Serum abpipettiert. 10 µl Serum wurden unter Zugabe von 20 ml Szintigel in das Packard Szintillationsspektrometer zum Zählen eingesetzt. Das Ergebnis wurde auf 1 ml Serum umgerechnet und in % der applizierten Dosis/ml Serum ausgedrückt.

5. Aufarbeitung von Galle und Urin

5.1. Bestimmung der Konzentration von ^{14}C-HB-Metaboliten in Galle und Urin

Das Volumen der ausgeschiedenen Galle- und Urinportionen wurde durch Wiegen der Probe auf einer Präzisionswaage bestimmt. Das spezifische Gewicht von Galle und Urin wurde zu diesem Zweck gleich 1,0 g/ml gesetzt. 10 µl von jeder Probe wurden mit 20 ml Szintigel versetzt und im Packard-Szintillationszähler gemessen. Aus dem Ergebnis ließ sich die in jeder Probe enthaltene Menge an Radioaktivität und damit auch die Menge von HB-Metaboliten berechnen.

5.2. Trennung der HB-Metabolite durch Dünnschichtchromatographie

Kieselgelplatten mit einer Schichtdicke von 0,25 mm fanden Verwendung zur Auftrennung der Metabolite in Galle und Urin. Mit einer Eppendorf-Pipette wurden je 10 µl natives Material von jeder Probe aufgetragen.

Die Entwicklung der Platten erfolgte in Desaga-Kammern, die 200 ml Fließmittel enthielten. Das Fließmittel war wie folgt zusammengesetzt:

15 Vol. %	0,4 n NH_4OH
85 Vol. %	n-Propanol

Bei einer Laufstrecke von 14,5 cm und einer konstanten Umgebungstemperatur von + 4°C betrug die Laufzeit ca. 8 Std. Die Kammern wurden zum Temperaturausgleich 1 Std. vor dem Einsetzen der Platten in die Kühlkammer gebracht. Nach der Entwicklung wurden die Platten bei + 70°C 10 Minuten getrocknet.

6. Auswertung der Dünnschichtchromographie

Jede Bahn auf der DC-Platte wurde in Feldern von 2 cm x 1 cm, beginnend mit 1 cm unterhalb der Auftragsstelle,ausgekratzt . Das gewonnene Material wurde in Zählgläschen gegeben, mit 2 ml 50 % Äthanol und 18 ml Scintigel versetzt und im Scintillationsspektrometer gezählt. Die Zugabe des Äthanol war notwendig, um besonders die polaren Metabolite vom Kieselgel zu lösen. Die Zähldauer betrug 2 x 5 min.

Nach Abzug der Leerwerte (ca. 40 cpm) ergaben die Meßwerte ein Laborprotokoll wie in Abb. 2 dargestellt. Definitionsgemäß wurden Metabolite mit einem Rf < ca. 0,5 als polare, Metabolite mit einem Rf > ca. 0,5 als unpolare HB-Stoffwechselprodukte bezeichnet. Geringe Schwankungen dieses Grenzwertes ergaben sich durch nicht ganz exakt reproduzierbare NH_4OH-Konzentrationen im Laufmittel. Die Summe der cpm im polaren und unpolaren Bereich wurde darauf für jede Fraktion auf die in der gesamten Fraktion enthaltene Anzahl an cpm umgerechnet. Die Summe der so erhaltenen Werte gibt die Anzahl der cpm/h an. Ins Verhältnis gesetzt zur applizierten Dosis ergibt sich die prozentuale Ausscheidung in einer Stunde.

Lauf-strecke cm	Laborprotokoll nach DC von je 10 µl Galle cpm G 1	G 2	G 3	G 4		cpm in der gesamten Fraktion G 1 171 µl	G 2 246 µl	G 3 248 µl	G 4 190 µl	cpm/h ausge-schieden	% Dosis/h 100 % = 19 911 500 cpm	HB-Metabolit µg/h/100 g KG
1	3	7	17	23		14364						
2	6	42	195	389	P		98621					
3	2	29	200	502	O			144113				
4	5	42	972	1190	L				106001	363 099	1,84	184
5	7	1041	2019	1322	A						≙ 87,3 %	
6	218	880	372	376	R						der ausgeschie-	
7	93	1038	1601	1535							denen Metabolit-	
8	506	930	435	242							menge	
9	15	32	58	102	U	4942						
10	41	108	181	175	N P		17515			57 661	0,27	27
11	186	419	481	399	O L			21353			≙ 12,7 %	
12	47	153	141	53	A R				13851			

Abb. 2 Berechnungsbeispiel für die Ausscheidung von polaren und unpolaren HB-Metaboliten in die Galle bei Kontrolltier Nr. 4

7. Versuchsmethoden zur Charakterisierung der polaren Metaboliten

7.1. Neomycin-Vorbehandlung

Nach der von El-HAWARI und Mitarb. (11) beschriebenen Methode erhielten 3 Tiere 4 Tage lang 2 x täglich jeweils 50 mg/kg KG Neomycinsulfat in 1 ml Ringer-Lösung per Schlundsonde. 3 Kontrolltiere bekamen gleichzeitig 1 ml Ringer-Lösung per Schlundsonde. Am 5. Tag erhielten alle Tiere oral die gleiche Menge gepoolter Galle, die ^{14}C-HB-Metaboliten in bekannter Aktivität enthielt. Bestimmt wurde die über 24 Std. im Urin ausgeschiedene Menge von ^{14}C-HB-Metaboliten.

7.2. Säurehydrolyse

Zur Untersuchung der hydrolytischen Spaltbarkeit der polaren Metaboliten wurde ^{14}C-HB-Metabolit-haltige Galle eines Kontrolltieres mit Salzsäure behandelt. Hierzu wurden zu gleichen Teilen Nativgalle und 0,4 n HCl über 60 min bei 95°C inkubiert und wie beschrieben chromatographiert.

7.3. ß-Glucuronidase-Behandlung

In 10 ml Acetatpuffer pH 4,8 wurden 6,25 mg ß-Glucuronidase gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden mit 40 µl Galle eines Kontrolltieres versetzt. Zum Vergleich wurden weitere 10 µl Galle mit reinem Acetatpuffer behandelt. Während 30 min wurden beide Ansätze bei 37°C inkubiert, anschließend wie angegeben chromatographiert.

7.4. Vorbehandlung mit ^{35}S-Sulfat und ^{14}C-Glucose

10 µCi ^{35}S-Sulfat wurde einem Versuchstier 6 Std. vor dem Versuch oral zugeführt. ^{14}C-Glucose mit einer Aktivität von 50 µCi erhielt ein nüchternes Tier oral 2 Std. vor dem Versuch. Im Versuch, der

ansonsten wie oben beschrieben durchgeführt wurde, wurde dann anschließend unmarkiertes Hexobarbital verwendet.

7.5. Behandlung der polaren Metaboliten mit Äthanol

Der durch DC dargestellte polare Anteil der HB-Metabolite wurde getrennt ausgekratzt und mit 50 % Äthanol vom Kieselgel eluiert. Das Eluat wurde 1 Std. bei 40°C inkubiert, anschließend eingeengt und erneut chromographiert.

8. Statistische Berechnungen

Die Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student berechnet. Für einen Teil der Werte in der Phenobarbital-vorbehandelten Gruppe wurden die 15 Minuten-Fraktionen-Werte als Grundlage zur Signifikanzberechnung nach dem U-Test genommen.

V METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN

1. Identifizierung der Metabolite auf der DC-Platte

Die Zusammensetzung des sowohl in der Galle, als auch im Urin auftretenden Peaks, der von uns als unpolarer Metabolit bezeichnet wird (Abb. 3), kann nach anderen Untersuchungen als bekannt angenommen werden.

1. Keto-HB und HO-HB machen bei gesunden Ratten 80 % der Ausscheidung im Urin aus, während HB und Nor-HB in nicht nennenswertem Umfang auftreten (4,21). Quantitativ entspricht der unpolare Metabolit diesen Angaben.

2. HEYNEN (20) zeigt, daß das bei Mikrosomeninkubation von HB ausschließlich entstehende 3'-Hydroxy-HB bei DC mit dem gleichen Laufmittel an die gleiche Stelle läuft, wie unser unpolarer Metabolit.

Da mit dem von uns verwendeten Laufmittel keine Trennung von Keto-HB und HO-HB erfolgt, sind weitere quantitative Aussagen über die Zusammensetzung des unpolaren Metaboliten nicht möglich.

HOLCOMB beschreibt das Auftreten von polaren HB-Metaboliten in der Galle von Versuchstieren (21). HEYNEN (20) weist bei ANIT-Cholestase im Urin eine bei gesunden Tieren nur geringfügig auftretende polare Metabolitenfraktion nach. Gesicherte Angaben über die stoffliche Zusammensetzung werden nicht gemacht.

2. Charakterisierung der polaren Metaboliten

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, handelt es sich wahrscheinlich nicht nur um einen einzigen Metaboliten. Das gleichsinnige Verhalten der Anteile der polaren Fraktion beim Vorliegen einer ANIT-Cholestase läßt vorläufig eine einheitliche Betrachtung zu.

Da die polaren Metabolite im Urin im Gegensatz zurGalle bei gesunden Tieren nur in geringem Maße auftreten und eine nennenswerte Ausscheidung mit den Faeces nicht stattfindet, muß angenommen werden, daß sie einen enterohepatischen Kreislauf durchmachen. Die nach der in IV. 7.1. beschriebenen Methode mit Neomycin-vorbehandelten Tieren (n = 3) schieden nur 71 % (66 - 75 %) der zugeführten, im wesentlichen polaren HB-Metabolite im Urin wieder aus, gegenüber 89 % (85 - 92 %) in der Kontrollgruppe (n = 3). Ein Einfluß, der durch Neomycin zerstörten Darmflora auf das Funktionieren des enterohepatischen Kreislaufes dieser Metaboliten ist daher naheliegend.

Dieser Befund führte zu der Annahme, daß es sich bei den polaren Metaboliten zumindest teilweise um Konjugate mit Glucuronsäure und Sulfat handeln könnte. Nach der in IV. 7.4. beschriebenen Methodik gelang es jedoch nicht nach DC von Galle ^{14}C- oder ^{35}S-Aktivität auf der DC-Platte an Stellen nachzuweisen, an denen bei Applikation von ^{14}C-HB Hexobarbitalmetaboliten auftraten. Hätte es sich um Glucuronsäure- oder Sulfatkonjugate gehandelt, wäre dies zu erwarten gewesen.

Nach IV. 7.3. wurde HB-Metabolit-haltige Galle einer Behandlung mit ß-Glucuronidase unterzogen. ß-Glucuronidase spaltet neben Glucuroniden auch Sulfat-Konjugate. Nach DC der Versuchsansätze ließen sich jedoch keine Veränderungen nachweisen, die auf eine spezifische Wirkung der ß-Glucuronidase auf die polaren Metaboliten hindeutet. Dieser Befund macht die Annahme von Glucuronsäure- oder Sulfatkonjugaten eher unwahrscheinlich.

Unterwirft man Galle eines Kontrolltieres nach IV. 7.2. einer leichten Säurehydrolyse, so zeigt sich nach DC (Abb. 4), daß dadurch die Menge der unpolaren Metaboliten um den gleichen Betrag zunimmt, um den die polaren Metaboliten abnehmen.

In einem weiteren Versuch wurden die polaren und unpolaren Metaboliten getrennt rechromatographiert (Methodik siehe IV.7.5.). Die unpolaren Metaboliten trennen sich hier im Vergleich zur Nativgalle besser, wobei der Gipfel mit dem niedrigeren Rf-Wert als 3'-HO-HB, der mit dem höheren Rf-Wert als 3'-Keto-HB gedeutet wird (Abb. 5). Die polaren Metaboliten waren jedoch durch die Eluierung vom Kieselgel mit 50 % Äthanol bei 40°C über 1 Std. stark verändert. Während ca. 50 % der polaren Metabolite an der üblichen Stelle gefunden wurden, befand sich der restliche Anteil an der gleichen Stelle, an der 3'-Keto-HB bei DC auftritt. Dieses Phänomen kann nicht auf die Rechromatographie zurückgeführt werden, da eine 2-dimensionale Chromatographie von Nativgalle nicht zu diesem Ergebnis führte. Allein die Behandlung mit 50 % Äthanol bei 40°C über 1 Std. kann für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden.

Während Versuche, die polaren Metabolite als Glucuronsäure- oder Sulfatkonjugate zu charakterisieren, keine positiven Ergebnisse erbrachten, zeigte sich andererseits, daß eher geringfügige physikalisch-chemische Einwirkungen in der Lage sind, die polare Fraktion eindeutig zu verändern. Diese Befunde lassen die polaren Metaboliten weniger als Konjugationsprodukte erscheinen, sondern legen vielmehr die Vermutung nahe, daß es sich um eine lockere Aggregation der Metaboliten an Gallenbestandteile handeln könnte. Ähnliche Vorstellungen entwickelten SCHARSCHMIDT und SCHMID (45) über die Exkretion von organischen Anionen in Gallensäuremicellen.

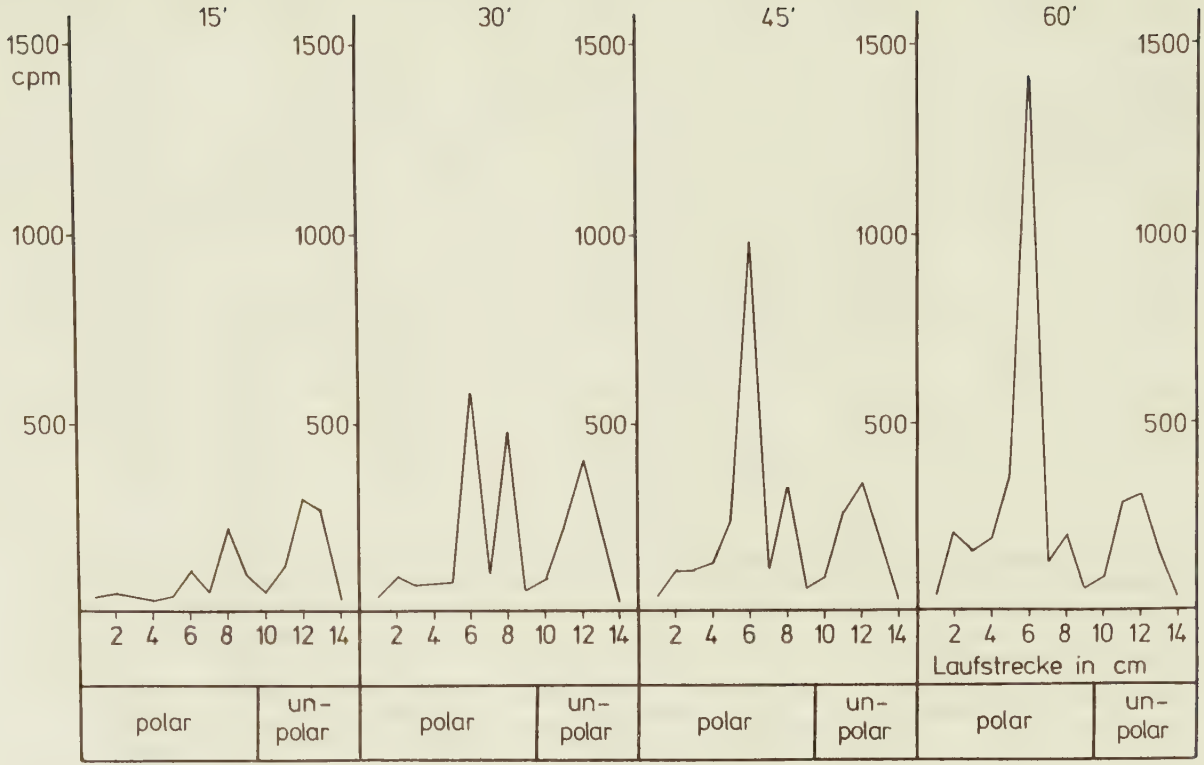

Abb. 3 a) Zeitliche Änderung des Metabolitenmusters in der Galle eines Kontrolltieres 15, 30, 45 und 60 Min. nach intraduodenaler Applikation von 100 mg/kg KG Hexobarbital und 5 µCi ^{14}C-Hexobarbital und anschließender Dünnschichtchromatographie.

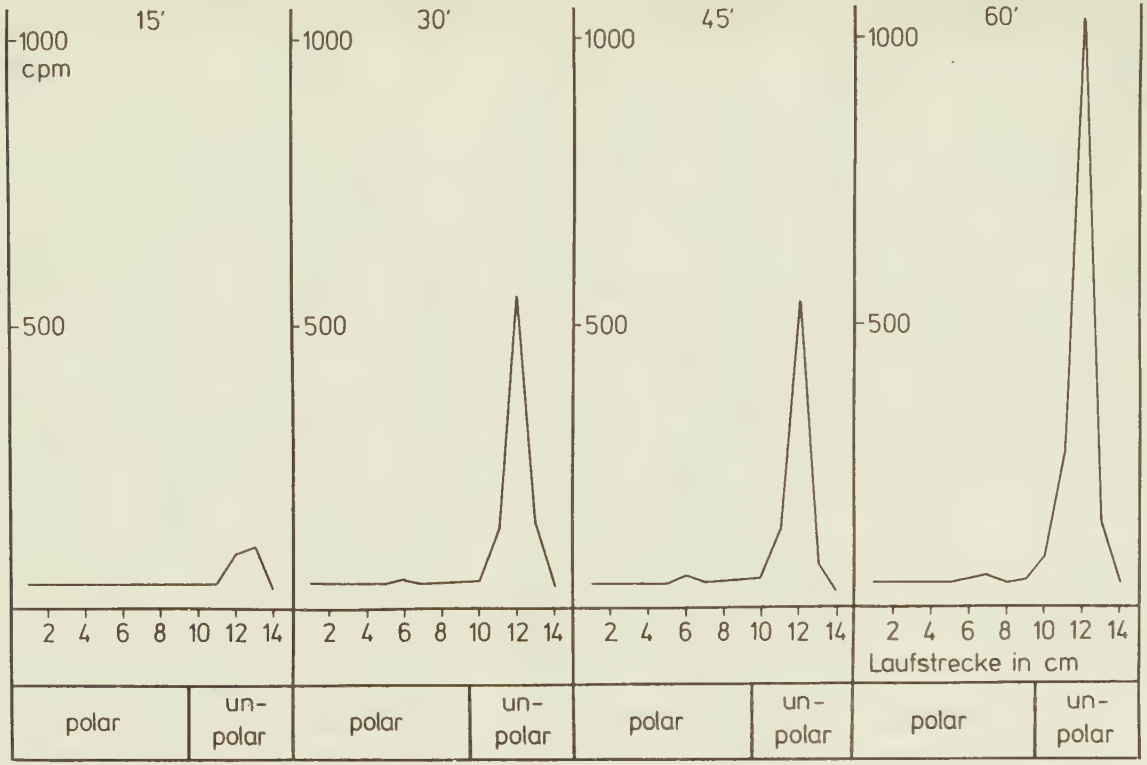

Abb. 3 b) Zeitliche Änderung des Metabolitenmusters im Urin eines Kontrolltieres 15, 30, 45 und 60 Min. nach intraduodenaler Applikation von 100 mg/kg KG Hexobarbital und 5 µCi ^{14}C-Hexobarbital und anschließender Dünnschichtchromatographie.

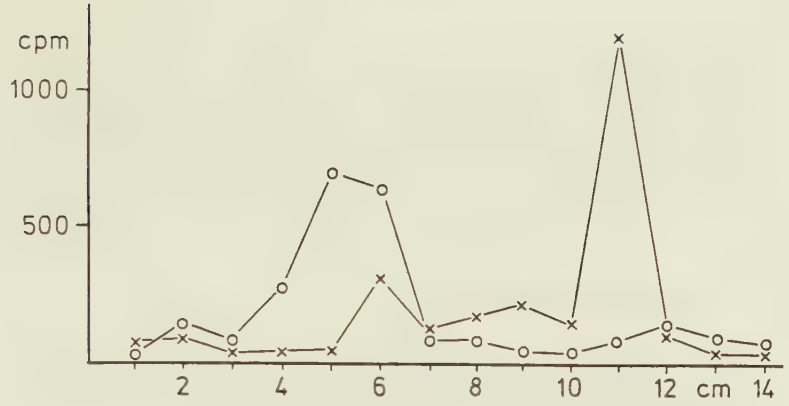

Abb. 4 DC der Galle eines Kontrolltieres nach Gabe von 100 mg/kg KG ^{14}C-HB vor (O) und nach (x) Hydrolyse mit 0,4 n-HCl bei 95°C während 1 h. Fliessmittel: Propanol/0,4 nNH_4OH 85:15 v/v.

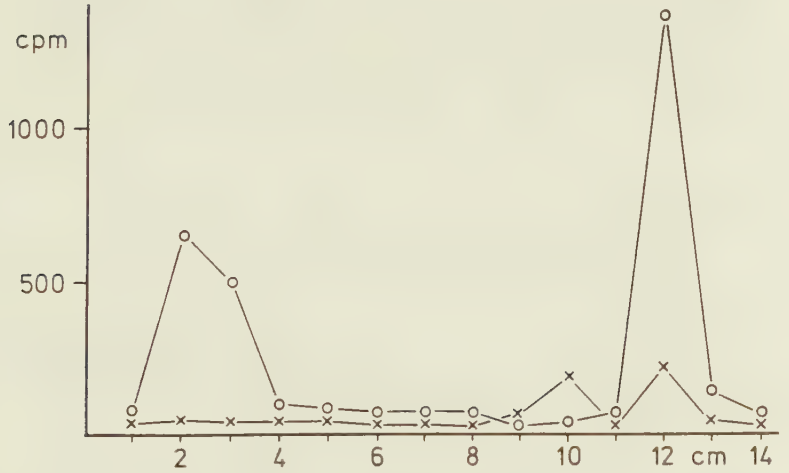

Abb. 5 Getrennte Rechromatographie der polaren (O) und unpolaren (x) Hexobarbitalmetaboliten nach Vorbehandlung mit 50 % Äthanol bei 40°C über 60 Min.

VI ERGEBNISSE

Die Rangfolge der Tiere (Tier Nr.) ist in allen Tabellen gleich und wurde nach der Galleproduktion (µl/h/100 gKG) festgelegt (siehe Tab. 8).

1. Leberfunktionsproben

Als laborchemische Parameter wurden Gesamt-Eiweiß, Bilirubin, die Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase im Serum der Versuchstiere bestimmt.

Außer einer Verminderung des Ges.E. zeigen Phenobarbital-vorbehandelte Tiere (Tab. 3) keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrolltieren (Tab. 1). In der ANIT-Gruppe (Tab. 2) steigen jedoch Bilirubin auf 0,85 mg/100 ml und die Aktivität der AP auf 454 U/l an, während das Ges.E. erniedrigt ist. Die Aktivität der GPT ist nicht signifikant erhöht. Diese Daten sind Ausdruck einer klinisch noch geringfügig ausgeprägten ANIT-Cholestase.

2. Gallensäureausscheidung in Galle und Urin und Gallensäurekonzentration im Serum

2.1. Galle (Tab. 4)

Die Ausscheidung von GCHDCH ist bei Phenobarbital-vorbehandelten Tieren, wenn auch nicht statistisch signifikant, erhöht, während die GCH-Ausscheidung in der gleichen Höhe liegt wie bei Kontrolltieren. Dagegen ist bei ANIT-Tieren die GCHDCH-Ausscheidung auf weniger als die Hälfte und die GCH-Ausscheidung auf ca. 75 % reduziert.

2.2. Urin (Tab. 5)

Während sowohl bei Kontrolltieren als auch bei PHENO-Tieren im Urin keine GCHDCH nachweisbar ist, findet man bei beiden GCH in geringer Menge. Bei Tieren mit ANIT-Cholestase wird GCHDCH im Urin nachweisbar. Die GCH-Ausscheidung im Urin ist besonders bei Tieren mit geringer Galleproduktion ANIT Nr. 1-3 erhöht, während das Tier mit hohem Gallefluß nur geringe Mengen ausscheidet.

2.3. Serum (Tab. 6)

Im Serum von Kontrolltieren sind 4,0 µmol/l GCH enthalten, GCHDCH ist nicht nachweisbar. Dagegen konnte bei 2 PHENO-Tieren GCHDCH nachgewiesen werden. Die GCH ist in diesem Kollektiv auf ein Drittel des Wertes der Kontrolltiere erniedrigt.

In der ANIT-Gruppe ist die Glykocholsäure um den Faktor 4 auf 15,7 µmol/l erhöht. Die stärkste Veränderung betrifft die GCHDCH-Konzentration, die einen Wert von 7,3 µmol/l erreicht.

3. Serumkonzentrationen von HB-Metaboliten

Alle drei Kollektive unterscheiden sich statistisch nicht signifikant. Mit der Erwartung steht in guter Übereinstimmung, daß ANIT-Tiere die höchsten und PHENO-Tiere die niedrigsten Serumspiegel aufweisen und Kontrolltiere im Mittel zwischen beiden Gruppen liegen (Tab. 7).

Tier Nr.	KG g	Ges.E. g/100 ml	Bilirubin mg/100 ml	AP U/l	GPT U/l
1	260	6,7	0,20	296	28
2	260	5,6	0,21	366	24
3	290	5,5	0,19	372	24
4	225	5,6	0,17	276	21
5	225	5,7	0,23	292	20
6	230	5,5	0,18	274	23
	248	5,8	0,20	296	23
	± 26	± 0,5	± 0,02	± 36	± 3

Tab. 1 Biologische Daten und Leberfunktionsproben der Tiere des Kontrollkollektives.

Tier Nr.	KG g	Ges.E. g/100 ml	Bilirubin mg/100 ml	AP U/l	GPT U/l
1	300	3,1	1,03	443	30
2	260	4,0	1,03	548	22
3	230	3,7	0,74	276	65
4	240	3,2	1,00	464	156
5	270	4,0	0,97	455	-
6	260	5,7	0,30	538	19
	260	4,0	0,85	454	58
	± 25	± 0,9	± 0,29	± 98	± 58
	n.s.	$p < 0,0025$	$p < 0,0005$	$p < 0,0005$	n.s.

Tab. 2 Biologische Daten und Leberfunktionsproben der Tiere mit ANIT-Cholestase 12 Std. nach oraler Applikation von 100 mg/kg KG ANIT (Signifikanzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet).

Tier Nr.	KG g	Ges.E. g/100 ml	Bilirubin mg/100 ml	AP U/l	GPT U/l
1	280	4,2	0,22	354	44
2	290	3,8	0,19	349	35
3	285	3,7	0,22	240	24
4	290	3,7	0,17	202	128
	286	3,9	0,20	286	58
	± 5	± 0,2	± 0,02	± 77	± 48
	$p < 0,025$	$p < 0,001$	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 3 Biologische Daten und Leberfunktionsproben der Tiere mit Phenobarbital-Vorbehandlung (Signifikanzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet).

Tier Nr.	Kontrollen		ANIT		PHENO	
	GCH nmol/h/100gKG	GCHDCH nmol/h/100gKG	GCH nmol/h/100gKG	GCHDCH nmol/h/100gKG	GCH nmol/h/100gKG	GCHDCH nmol/h/100gKG
1	2257	119	-	0,1	1435	128
2	2508	710	-	47,0	1234	558
3	1859	513	-	16,0	2439	2574
4	-	-	312	1,7	1680	1142
5	2151	192	616	9,7		
6	1817	328	3506	812,0		
	2118	372	1478	148	1697	1101
	± 287	± 241	± 1763	± 326	± 527	± 1067
			n.s.	$p < 0,05$	n.s.	n.s.

Tab. 4 Ausscheidung von Glykocholsäure (GCH) und Glykochenodesoxycholsäure (GCHDCH) in die Galle bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrolltiere).

Tier Nr.	Kontrollen		ANIT		PHENO	
	GCH nmol/h/100gKG	GCHDCH nmol/h/100gKG	GCH nmol/h/100gKG	GCHDCH nmol/h/100gKG	GCH nmol/h/100gKG	GCHDCH nmol/h/100gKG
1	0,01	0	33	0,4	0,46	0
2	0,0	0	11	10,6	0,12	0
3	0,22	0	90	0,0	0,42	0
4	0,47	0	9	0,0	0,14	0
5	0,81	0	5	5,3		
6	0,0	0	0,4	0,0		
	0,25	0	25	2,7	0,29	0
	± 0,33		± 34	± 4,4	± 0,18	
			$p < 0,1$	$p < 0,1$	n.s.	

Tab. 5 Ausscheidung von Glykocholsäure (GCH) und Glykochenodesoxycholsäure (GCHDCH) in den Urin bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrolltiere).

	Kontrollen		ANIT		PHENO	
Tier Nr.	GCH µmol/l	GCHDCH µmol/l	GCH µmol/l	GCHDCH µmol/l	GCH µmol/l	GCHDCH µmol/l
1	3,6	0	32,7	5,2	0,1	0,0
2	3,3	0	18,0	21,3	0,8	0,0
3	4,7	0	10,4	8,1	1,6	0,2
4	2,8	0	10,7	4,4	2,7	0,2
5	5,9	0	12,0	1,3		
6	3,6	0	10,5	3,3		
	4,0	0	15,7	7,3	1,3	0,1
	± 1,1		± 8,1	± 7,2	± 1,1	± 0,1
			$p < 0,005$	$p < 0,025$	$p < 0,005$	$p < 0,05$

Tab. 6 Serumkonzentration von Glykocholsäure (GCH) und Glykochenodesoxycholsäure (GCHDCH) bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrolltiere).

Tier	Nr.	15'	30'	45'	60'	$\bar{s}$
KONTROLLEN	1	0,21	0,23	0,21	0,22	0,22
	2	0,16	0,20	0,21	0,23	0,20
	3	0,30	0,37	0,48	0,34	0,37
	4	0,26	0,36	0,35	0,33	0,33
	5	0,43	0,62	0,55	0,67	0,57
	6	0,41	0,39	0,38	0,32	0,38
		0,30	0,36	0,36	0,35	0,35
		± 0,11	± 0,15	± 0,14	± 0,16	± 0,13
ANIT	1	0,21	0,30	0,32	0,36	0,30
	2	0,38	0,49	0,46	0,47	0,45
	3	0,31	0,46	0,53	0,54	0,46
	4	0,41	0,60	0,57	0,64	0,56
	5	0,25	0,47	0,41	-	0,38
	6	0,33	0,41	0,41	0,37	0,38
		0,32	0,46	0,45	0,48	0,42
		± 0,08	± 0,10	± 0,09	± 0,12	± 0,09
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PHENO	1	0,31	0,33	0,47	0,41	0,38
	2	0,16	0,21	0,26	0,25	0,22
	3	0,15	0,27	0,29	0,31	0,26
	4	0,17	0,24	0,26	0,29	0,24
		0,20	0,26	0,32	0,32	0,28
		± 0,08	± 0,05	± 0,10	± 0,07	± 0,07
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 7 Serumkonzentration von HB und HB-Metaboliten in % Dosis/ml Serum bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv 15, 30, 45 und 60 min. nach Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB (Signifikanzen in Bezug auf das Kontrollkollektiv).

4. HB-Metabolitenmuster in Galle und Urin

Abb. 3 a) und 3 b) (siehe V.1.) zeigen exemplarisch das Metabolitenmuster eines Kontrolltieres nach Gabe von 100 mg/kgKG HB und 5 µCi ^{14}C-HB in Galle und Urin. Das DC-Verfahren ist in IV.5. beschrieben. Annähernd gleich bleibt während des ganzen Versuches die Konzentration der unpolaren Metaboliten (cm 11 - 13 der Laufstrecke) in der Galle, während im Urin ein Anstieg zu verzeichnen ist. Der polare Metabolit bei cm 8 der Laufstrecke durchläuft in der 30-Min.-Fraktion ein Maximum der Konzentration und nimmt danach wieder ab. Den insgesamt größten Anteil bildet der polare Metabolit bei cm 6 der Laufstrecke. Er nimmt stetig zu. Im Urin treten polare Metabolite nur geringfügig auf.

Nach Gabe von 100 mg/kg KG ANIT oral ergeben sich im Vergleich zum Kontrollkollektiv die in Abb. 6 dargestellten Veränderungen. Die DC gibt keinen Hinweis darauf, daß bei ANIT-Cholestase alternative Metabolite gebildet werden. Auffallend ist das praktisch völlige Verschwinden der polaren Metabolite in der Galle von ANIT-Tieren. Im Urin zeigen jedoch nur diese Tiere eine deutliche Ausscheidung im polaren Bereich. Phenobarbitalvorbehandlung führt zu keinen Veränderungen im Metabolitenmuster gegenüber dem Kontrollkollektiv.

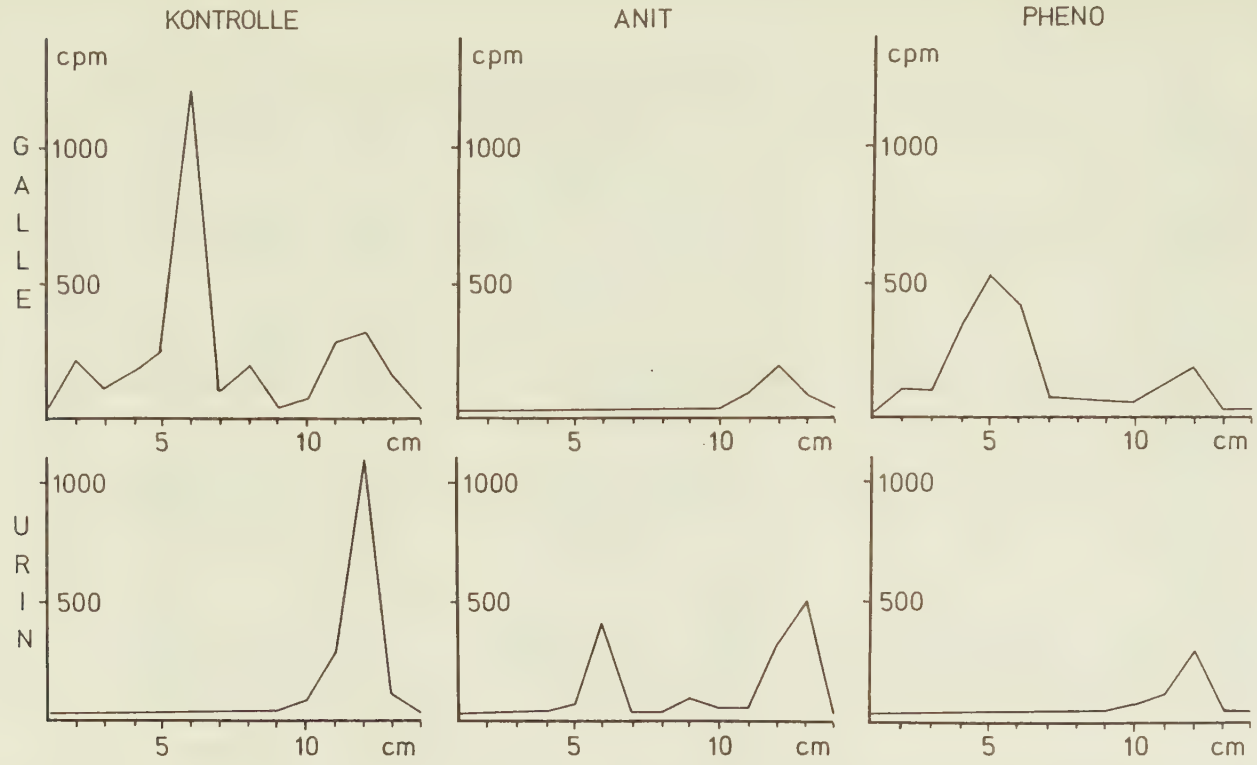

Abb. 6 Beispiele für Metabolitenmuster in der Galle (obere Reihe) und im Urin (untere Reihe) jeweils 60 Min. nach intraduodenaler Applikation von 100 mg/kg KG Hexobarbital und 5 µCi ^{14}C-Hexobarbital bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zu Kontrolltieren.

5. Ausscheidung von HB-Metaboliten in Galle und Urin (Tab. 8, 9)

Kontrolltiere und Phenobarbital-vorbehandelte Tiere weisen eine gleiche Galleproduktion von durchschnittlich 406 bzw. 373 µl/h/100 g KG auf. Demgegenüber ist der Gallefluß 12 Std. nach Applikation von 100 mg/kg KG ANIT oral um mehr als die Hälfte auf 175 µl/h/100 g KG reduziert. Die Einzelwerte reichen hierbei von hochnormalen 541 bis herab zu nur 8 µl/h/100 g KG. Von der applizierten Dosis von 100 mg/kg KG Hexobarbital scheiden Kontrolltiere und PHENO-Tiere im Mittel 4,15 %/Dosis/h bzw. 2,06 %/Dosis/h aus. Ebenfalls signifikant, aber noch wesentlich stärker eingeschränkt, ist die Ausscheidung bei ANIT-Cholestase. 0,21 %/Dosis/h sind hier nur noch ca. 5 % des Vergleichswertes der Kontrolltiere.

Einer gleichmäßigen Urinproduktion von ca. 500 µl/h/1oo g KG in allen drei Kollektiven steht eine gleichmäßige HB-Metabolit-Ausscheidung von 0,93 %/Dosis/h bei Kontrolltieren, 1,13 %/Dosis/h bei ANIT-Cholestase und 1,10 %/Dosis/h nach Phenobarbital-Vorbehandlung gegenüber.

6. Prozentualer Anteil polarer und unpolarer HB-Metaboliten an der Ausscheidung in Galle und Urin (Tab. 10,11, Abb. 7, 8)

In der Galle von Kontrolltieren und PHENO-Tieren stehen polare und unpolare Metaboliten in einem Verhältnis von 4:1. Dieses Verhältnis kehrt sich bei ANIT-Cholestase nach 1:9 um.

Kontrolltiere und PHENO-Tiere scheiden im Urin zu 90 % unpolare Metabolite aus, während das Verhältnis polarer zu unpolare Metabolite bei ANIT-Cholestase im Urin 1:3 beträgt.

7. Absolute Mengen polarer und unpolarer HB-Metaboliten in Galle und Urin (Tab. 12, 13, Abb. 9, 10)

Nach Applikation von 100 mg/kg KG HB scheiden Kontrolltiere in 1 Std. nach intraduodenaler Gabe 352 µg/h/100 g KG als polare und 63 µg/h/100 g KG als unpolare Metabolite in die Galle aus. Nach Phenobarbitalvorbehandlung sind diese Werte um die Hälfte reduziert. Demgegenüber ist bei ANIT-Cholestase die ausgeschiedene Menge der unpolaren Metabolite vierfach auf 16,1 µg/h/100 g KG und die Menge der polaren Metabolite um fast zwei Größenordnungen auf 5,3 µg/h/100 g KG erniedrigt.

Im Urin werden die unpolaren Metabolite von allen drei Kollektiven in annähernd gleicher Menge ausgeschieden. Im Mittel scheiden Kontrolltiere 89 µg/h/100 g KG, ANIT-Tiere 83 µg/h/100 g KG und PHENO-Tiere 100 µg/h/100 g KG aus. Während die Ausscheidung polarer Metabolite bei Phenobarbital-vorbehandelten Tieren nicht signifikant auf 10,3 µg/h/100 g KG gegenüber 4,7 µg/h/100 g KG bei Kontrolltieren erhöht ist, steigt sie bei ANIT-Tieren deutlich auf 30 µg/h/100 g KG an.

8. Gesamtausscheidung von HB-Metaboliten (Tab. 14)

Von einer HB-Dosis von 100 mg/kg KG scheiden Kontrolltiere in 1 Std. 5,09 % in Galle und Urin zusammen aus. Bei PHENO-Tieren ist dieser Wert nicht signifikant auf 3,16 % gesenkt. ANIT-TIERE scheiden jedoch insgesamt nur ca. ein Viertel, d. h. 1,34 % aus.

Relativ konstant bleibt die ausgeschiedene Menge von unpolaren Metaboliten mit 151 µg/h/100 g KG bei Kontrolltieren, 135 µg/h/100 g KG nach Phenobarbital-Induktion und 99 µg/h/100 g KG bei ANIT-Tieren.

Kontrolltiere scheiden 357 µg/h/100 g KG polare Metabolite aus. Bei PHENO-Tieren werden 168 µg/h/100 g KG in Form von polaren Metaboliten ausgeschieden; stark reduziert ist diese Fraktion bei ANIT-Tieren auf 35,3 µg/h/100 g KG.

	Kontrollen		ANIT		PHENO	
Tier Nr.	Galle-produktion µl/h/100 g KG	^{14}C-Aktivität % Dosis/h	Galle-produktion µl/h/100 g KG	^{14}C-Aktivität % Dosis/h	Galle-produktion µl/h/100 g KG	^{14}C-Aktivität % Dosis/h
1	264	3,22	8	0,01	372	3,41
2	330	3,33	70	0,06	372	1,79
3	342	10,00	87	0,08	373	1,41
4	380	2,11	111	0,14	376	1,63
5	518	2,44	230	0,21		
6	603	3,82	541	0,78		
	406	4,15	175	0,21	373	2,06
	± 128	± 2,93	± 194	± 0,29	± 2	± 0,91
			$p < 0,025$	$p < 0,005$	n.s.	$p < 0,05$

Tab. 8 Galleproduktion und Ausscheidung von HB und HB-Metaboliten in die Galle, berechnet nach der ausgeschiedenen ^{14}C-Aktivität bei Tieren mit ANIT-Cholestase und Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg KG und 5 µCi ^{14}C-HB (Signifikanzen beziehen sich auf das Kontrollkollektiv).

Tier Nr.	Kontrollen		ANIT		PHENO	
	Urin-produktion µl/h/100 g KG	^{14}C-Aktivität % Dosis/h	Urin-produktion µl/h/100 g KG	^{14}C-Aktivität % Dosis/h	Urin-produktion µl/h/100 g KG	^{14}C-Aktivität % Dosis/h
1	507	0,70	150	0,50	989	2,39
2	251	0,20	528	1,21	332	0,41
3	349	0,60	436	1,21	673	0,93
4	339	0,14	381	1,92	394	0,67
5	1438	2,77	263	0,70		
6	926	1,18	729	1,21		
	635	0,93	415	1,13	597	1,10
	± 461	± 0,98	± 203	± 0,50	± 300	± 0,89
			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 9 Urinproduktion und Ausscheidung von HB und HB-Metaboliten in den Urin, berechnet nach der ausgeschiedenen ^{14}C-Aktivität, bei Tieren mit ANIT-Cholestase und Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg KG und 5 µCi ^{14}C-HB (Signifikanzen beziehen sich auf das Kontrollkollektiv).

	Kontrollen		ANIT		PHENO	
Tier Nr.	polarer Metabolit %	unpolarer Metabolit %	polarer Metabolit %	unpolarer Metabolit %	polarer Metabolit %	unpolarer Metabolit %
1	80,2	18,8	7,6	92,4	83,8	16,2
2	74,0	26,0	4,0	96,0	83,1	16,9
3	90,8	9,2	9,2	90,8	66,9	33,1
4	87,3	12,7	5,7	94,3	93,9	6,1
5	75,7	24,3	6,3	93,7		
6	87,2	12,8	36,8	63,2		
	82,5	17,5	11,6	88,4	81,9	18,1
	± 6,9	± 6,9	± 12,5	± 12,5	± 11,2	± 11,2
			$p < 0,0005$		n. s.	

Tab.10 Prozentuales Verhältnis der polaren und unpolaren HB-Metabolite nach Auftrennung durch DC in der Galle bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg KG und 5 µCi ^{14}C-HB (Signifikanzen beziehen sich auf das Kontrollkollektiv).

Tier Nr.	Kontrollen		ANIT		PHENO	
	polarer Metabolit %	unpolarer Metabolit %	polarer Metabolit %	unpolarer Metabolit %	polarer Metabolit %	unpolarer Metabolit %
1	8,1	91,9	27,3	72,7	10,9	89,1
2	12,4	87,6	25,9	74,1	10,7	89,3
3	10,5	89,5	33,5	66,5	3,3	96,7
4	8,2	91,8	28,3	71,7	11,5	88,5
5	2,6	97,4	21,7	78,3		
6	4,4	95,6	20,7	79,3		
	7,7	92,3	26,2	73,8	9,1	90,9
	± 3,7	± 3,7	± 4,7	± 4,7	± 3,9	± 3,9
			$p < 0,001$		n. s.	

Tab. 11 Prozentuales Verhältnis der polaren und unpolaren HB-Metabolite nach Auftrennung durch DC im Urin bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg KG und 5µCi ^{14}C-HB (Signifikanzen beziehen sich auf das Kontrollkollektiv).

Abb. 7 Prozentuales Verhältnis der polaren und unpolaren HB-Metabolite in der Galle von Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg KG Hexobarbital.

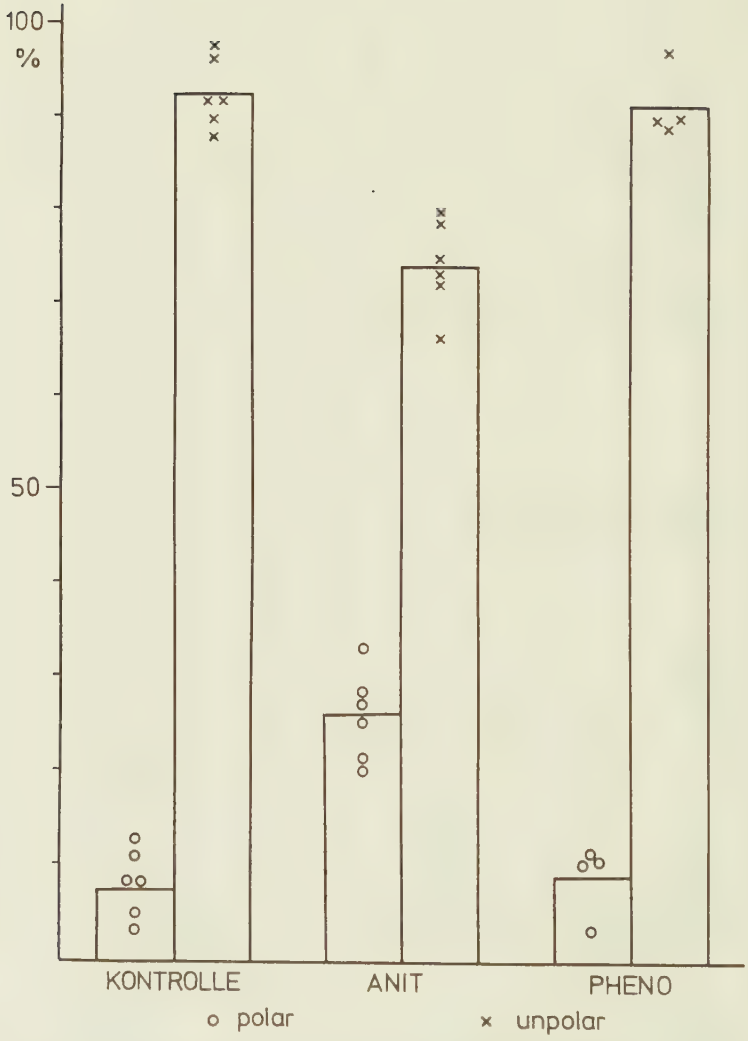

Abb. 8 Prozentuales Verhältnis der polaren und unpolaren HB-Metabolite im Urin von Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg KG Hexobarbital.

Tier Nr.	Kontrollen		ANIT		PHENO	
	polarer Metabolit µg/h/100 g KG	unpolarer Metabolit µg/h/100 g KG	polarer Metabolit µg/h/100 g KG	unpolarer Metabolit µg/h/100 g KG	polarer Metabolit µg/h/100 g KG	unpolarer Metabolit µg/h/100 g KG
1	258	61	0,08	0,9	286	55
2	246	87	0,24	5,8	149	30
3	908	92	0,74	7,3	44	47
4	184	27	0,79	13,0	153	10
5	185	59	1,33	20,0		
6	333	49	28,70	49,3		
	352	63	5,3	16,1	158	36
	± 278	± 24	±11,5	± 17,6	± 99	± 20
			$p < 0,01$	$p < 0,005$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Tab. 12 Ausscheidung von polaren und unpolaren HB-Metaboliten in die Galle bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg KG Hexobarbital (Signifikanzen in Bezug auf das Kontrollkollektiv berechnet).

	Kontrollen		ANIT		PHENO	
Tier Nr.	polarer Metabolit µg/h/100 g KG	unpolarer Metabolit µg/h/100 g KG	polarer Metabolit µg/h/100 g KG	unpolarer Metabolit µg/h/100 g KG	polarer Metabolit µg/h/100 g KG	unpolarer Metabolit µg/h/100 g KG
1	5,7	64	14	36	26,0	213
2	2,5	18	31	90	4,4	37
3	6,3	54	41	80	3,1	90
4	1,1	13	54	138	7,7	59
5	7,2	270	15	55		
6	5,2	113	25	96		
	4,7	89	30	83	10,3	100
	± 2,4	± 96	± 16	± 35	± 10,6	± 79
			$p < 0,0025$	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 13 Ausscheidung von polaren und unpolaren HB-Metaboliten in den Urin bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg KG Hexobarbital (Signifikanzen in Bezug auf das Kontrollkollektiv berechnet).

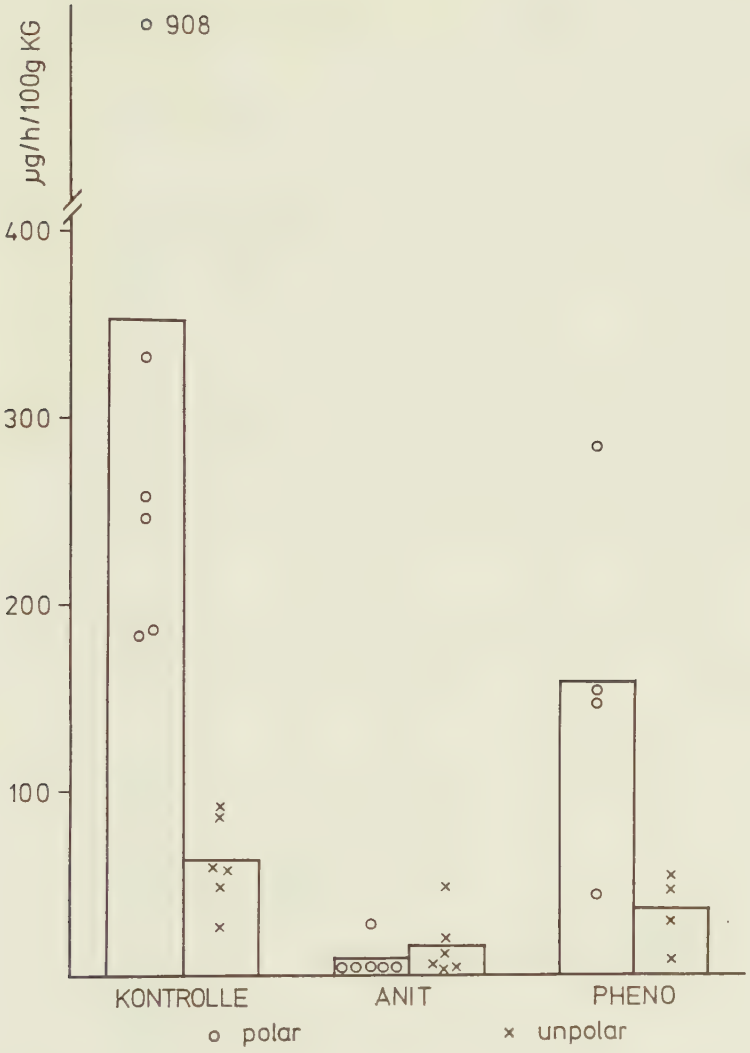

Abb. 9 Ausscheidung von polaren und unpolaren HB-Metaboliten in die Galle bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg Hexobarbital.

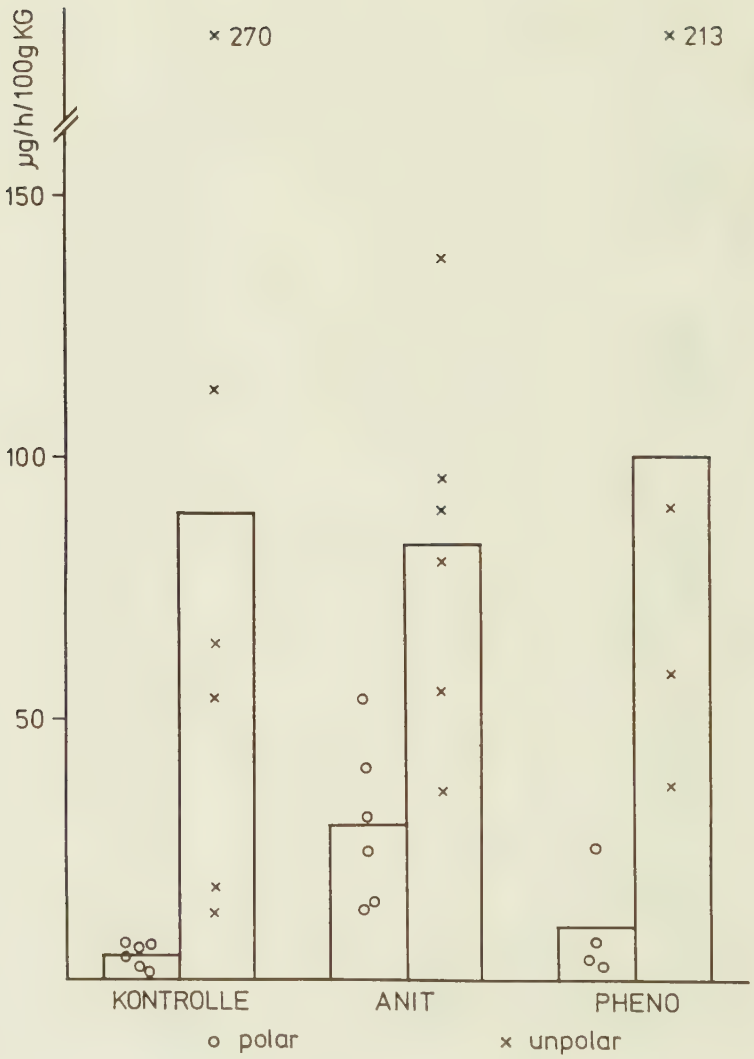

Abb. 10 Ausscheidung von polaren und unpolaren HB-Metaboliten in den Urin bei Tieren mit ANIT-Cholestase und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg KG Hexobarbital.

	Kontrollen			ANIT			PHENO		
Tier Nr.	Gesamtausscheidung % Dosis/h	Metabolit polar µg/h/100 g KG	unpolar	Gesamtausscheidung % Dosis/h	Metabolit polar µg/h/100 g KG	unpolar	Gesamtausscheidung % Dosis/h	Metabolit polar µg/h/100 g KG	unpolar
1	3,92	264	125	0,51	14,1	36,9	5,80	312	268
2	3,53	249	105	1,27	31,2	95,8	2,20	153	67
3	10,60	914	146	1,29	41,7	87,3	2,34	47	137
4	2,25	185	40	2,06	54,8	151,0	2,30	161	69
5	5,21	192	329	0,91	16,3	75,0			
6	5,00	338	162	1,99	53,7	145,3			
	5,09	357	151	1,34	35,3	99	3,16	168	135
	± 2,91	± 278	± 97	± 0,60	± 17,8	± 43	± 1,76	± 109	± 94
				$p < 0,01$	$p < 0,01$	n.s.	n.s.	$p < 0,05$	n.s.

Tab. 14 Gesamtausscheidung von HB-Metaboliten und Anteil von polaren und unpolaren Metaboliten an der Gesamtausscheidung bei Kontrolltieren, Tieren mit ANIT-Cholestase und Phenobarbital-vorbehandlten Tieren nach Applikation von 100 mg/kg KG Hexobarbital (Signifikanzen beziehen sich auf das Kontrollkollektiv).

VII DISKUSSION

Der Diskussion sollen in einer kurzen Zusammenfassung die wesentlichen Ergebnisse vorangestellt werden:

1. 12 Stunden nach oraler Gabe von 100 mg/kg KG ANIT ist in der Versuchsgruppe eine geringgradige Cholestase festzustellen. Die Serum-Gallensäuren sind um den Faktor 5 erhöht, die Galleproduktion ist um mehr als die Hälfte reduziert. Als Leitenzym der Cholestase ist die alkalische Phosphatase deutlich, das Serumbilirubin nur wenig erhöht.

2. ANIT-vorbehandelte Tiere scheiden während einer Stunde weniger ^{14}C-HB-Metabolite aus als Kontrolltiere. Während im Urin in beiden Kollektiven ca. 1 % der Dosis ausgeschieden wird, erscheinen bei ANIT-Tieren nur 0,21 % der applizierten Dosis im Versuchszeitraum in der Galle im Vergleich zu 4,15 % der Dosis in der Kontrollgruppe.

3. Die polare Metabolitfraktion hat bei Kontrolltieren in der Galle einen Anteil von 82,5 %. Demgegenüber finden sich in der Galle von ANIT-Tieren nur 11,6 % polare Metabolite. Im Urin werden in der ANIT-Gruppe 26,2 % polare Metabolite ausgeschieden gegenüber einem Anteil von 7,7 % in der Kontrollgruppe.

4. Phenobarbital-vorbehandelte Tiere verhalten sich in der Verteilung der ^{14}C-HB-Metabolite auf die polare und unpolare Fraktion in Galle und Urin wie Kontrolltiere. Lediglich die absolute Metabolit-Ausscheidung in die Galle ist im Vergleich zur Kontrollgruppe auf die Hälfte reduziert.

Wegen der leichten Zugänglichkeit ist der Ausscheidung von HB-Metaboliten in den Urin bisher größere Aufmerksamkeit geschenkt worden als den Transport- und Metabolisierungsvorgängen, die zu ihrer renalen Exkretion führen.

So ist bekannt, daß 95 % einer Dosis von HB im Urin wiedergefunden werden. Nur 4 % werden mit den Faeces ausgeschieden. Die Metabolite verteilen sich im Urin zu 19 % der Dosis auf 3'-Hydroxy-HB, 59 % der Dosis 3'-Keto-HB, 10 % der Dosis 1,5-Dimethylbarbitursäure und jeweils weniger als 1 % der Dosis HB, Nor-HB und 1',2'-Epoxid-HB. Dieser Gruppe von vergleichsweise unpolaren Substanzen, die ca. 90 % der Metabolite im Urin darstellt, steht nur ein geringer Anteil von polarem Material mit ca. 5 % gegenüber (21,55). Mit diesen bekannten Tatsachen stehen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse in guter Obereinstimmung. Das von uns gefundene Verhältnis von polaren zu unpolaren Metaboliten im Urin betrug 7,7 % zu 92,3 %.

HOLCOMB u. Mitarb. (21) beschreiben in der Galle das überwiegende Auftreten von polaren Metaboliten, ohne nähere quantitative oder qualitative Charakterisierung. Es finden sich jedoch Angaben über das Verhalten dieser Metaboliten, die wohl identisch sind mit den von uns gefundenen polaren Substanzen. 1. Sie erscheinen nur in unwesentlicher Menge im Urin. 2. Bei der Inkubation von Leberhomogenat mit HB finden sich nur Spuren polarer Substanz. 3. Versuche mit isoliert perfundierten Lebern zeigten,daß die polaren Metabolite in relativ bescheidenem Umfang im Lebergewebe, in viel geringerer Menge im Perfusat und als überwiegende Fraktion in der Galle gefunden werden können.

Wird diesem Metaboliten bei Cholestase die Ausscheidung in die Galle verwehrt, so findet er sich vermehrt im Urin. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen von HEYNEN überein (20).

Die polaren HB-Metaboliten haben somit folgende Eigenschaften:

1. Sie werden in der intakten Leber gebildet und beim gesunden Tier fast ausschließlich in die Galle ausgeschieden.

2. Sie sind wesentlich polarer als bisher bekannte HB-Metabolite.

3. Sie durchlaufen einen enterohepatischen Kreislauf und werden letztendlich zu unpolaren Metaboliten umgewandelt im Urin ausgeschieden.

4. Bei Cholestase erscheinen sie im Urin.

Im folgenden soll versucht werden aus diesen Eigenschaften Hinweise auf eine mögliche stoffliche Zusammensetzung zu erhalten.

Nach MILLBURN (30) ist das Molekulargewicht eine empirische Bestimmungsgröße für den Grad der Ausscheidung einer Substanz in die Galle. Dabei steht das Molekulargewicht in enger Beziehung zur Lipophilie einer Substanz. Darüberhinaus ist das Vorhandensein von polaren Gruppen Grundlage der Gallengängigkeit. Innerhalb eines Molekulargewichtsbereiches von ca. 300 bis über 400 werden Substanzen sowohl in die Galle als auch Urin ausgeschieden, wobei bei Verlegung des einen Weges der andere kompensatorisch beschritten wird. Unterhalb dieses Bereiches erfolgt die Ausscheidung praktisch nur über die Nieren, bei Molekulargewichten über ca. 500 werden Substanzen fast nur mit der Galle sezerniert. In diesen Fällen ist eine kompensatorische Ausscheidung über den jeweils alternativen Weg höchstens in ungenügendem Umfang möglich.

Alle in dieser Arbeit als unpolar bezeichneten HB-Metabolite liegen mit ihrem Molekulargewicht unterhalb des Grenzwertes von 300. Dementsprechend werden sie auch bevorzugt in den Urin ausgeschieden. Die polaren Metabolite sind stark cholephil und werden bei Cholestase nur unvollständig renal eliminiert. Ob es sich hierbei um einen Einfluß des Molekulargewichtes oder der Cholestase handelt, kann nicht entschieden werden. Es liegt jedoch nahe, anzunehmen, daß die polaren HB-Metabolite ein höheres Molekulargewicht haben als die

Ausgangssubstanz Hexobarbital.

Eine solche Anhebung des Molekulargewichtes wird durch die Bildung von Konjugaten ermöglicht, wobei Glucuronsäure, Sulfat und Aminosäuren wie Glutathion häufige Partner sind. Ausgehend von den primären Stoffwechselprodukten des HB 3'-Hydroxy-HB und 1',2'-Epoxid-HB sind Konjugationsreaktionen grundsätzlich denkbar. TOKI und TAKENOUCHI (51) isolierten aus Kaninchenurin das von 3'-OH-HB abgeleitete Glucuronid. Denkbar wäre auch die Bildung eines Sulfatkonjugates von 3'-OH-HB. 1',2'-Epoxid-HB scheint geeignet, eine Verbindung mit Glutathion einzugehen.

Unsere methodischen Untersuchungen erbrachten über diesen Punkt keine Klarheit. Es gelang nicht, die polare Metabolitfraktion durch ^{14}C-Glucose oder ^{35}S-Sulfat zu markieren. Ebenso war ß-Glucuronidase nicht in der Lage, die polaren Metabolite spezifisch zu verändern. Erwartungsgemäß wurde durch Säurehydrolyse ein Teil der polaren Fraktion quantitativ in unpolare Metabolite umgewandelt (20,51). Bemerkenswert ist jedoch, daß die sehr milde Behandlung mit 50 % Äthanol bei 40°C über 1 Std. in der Lage war, die polaren Metabolite zu 50 % in einen unpolaren Metaboliten mit einem Rf-Wert wie 3'-Keto-HB zu überführen. Sicherlich kann dieser Befund kein Beweis gegen die Konjugatnatur der polaren Metabolite sein, doch läßt er immerhin daran denken, daß es sich möglicherweise um ein lockeres Assoziationsprodukt an andere Bestandteile der Galle handeln könnte.

VONK u. Mitarb. (56) und SCHARSCHMID und SCHMID (45) zeigten, daß Substanzen wie Bromsulphthalein, Indocyaningrün und konjugiertes Bilirubin in einer im Vergleich zum Serum hohen Konzentration in die Galle ausgeschieden werden. Dies wird ermöglicht durch eine Bindung dieser Stoffe an Gallensäuremicellen. Grundsätzlich kann man diese Möglichkeit auch für HB-Metabolite in Erwägung ziehen.

Aus der Tatsache, daß polare Metabolite vom intakten Tier praktisch nicht ausgeschieden werden (4,20,21,55), während sie das

Hauptstoffwechselprodukt sind, das die Leber verläßt, folgt, daß sie einen enterohepatischen Kreislauf durchmachen und hierbei in unpolare Metabolite, d. h. überwiegend 3'-Keto-HB, umgewandelt werden. El-HAWARI und PLAA (10) zeigten die Bedeutung des enterohepatischen Kreislaufes für Phenytoinkonjugate mit Glucuronsäure. Vor der enteralen Rückresorption werden diese Konjugate wohl vornehmlich durch die ß-Glucuronidase enthaltende Darmflora gespalten, um dann wieder zumindest teilweise konjugiert in der Galle zu erscheinen. Ähnliches Verhalten zeigten die polaren HB-Metaboliten in unseren Versuchen. Führt man einem intakten Tier oral ^{14}C-HB-Metabolite enthaltende Galle zu, so findet man ca. 90 % der Aktivität im Urin wieder. Zerstört man durch Neomycin die natürliche Darmflora, werden nur noch ca. 70 % renal eliminiert. Die Bakterienflora scheint auch hier von Bedeutung für das Funktionieren des enterohepatischen Kreislaufs zu sein. Bei dem hohen Anteil des polaren Metaboliten in der Galle beeinflußt der enterohepatische Kreislauf wohl auch entscheidend die biologische Halbwertszeit des Hexobarbital.

Die Phenobarbitalvorbehandlung führte nicht zu der erwarteten Steigerung der HB-Metabolisierung (5,43,50,58). Die Ausscheidung sowohl der polaren als auch der unpolaren Metaboliten in die Galle war um ca. 50 % vermindert. Nachdem darüberhinaus keine bedeutenden Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe festzustellen sind, fällt eine Erklärung dieses Befundes schwer. Während GLAZER und SARTORELLI (15) zeigen konnten, daß nach Phenobarbitalgabe in der Leber vermehrt Protein gebildet wird, wiesen TUMA u. Mitarb. (52) nach, daß Phenobarbital dosisabhängig die Sekretion von Glykoproteinen durch die Leber vermindert wird.

Wenn daraus auch keine Interpretation der Ergebnisse folgen kann, darf man doch wohl feststellen, daß Phenobarbital nicht in jeder Hinsicht den Stoffwechsel der Leber stimulierend beeinflußt.

Gegenüber anderen experimentellen Leberschädigungen scheint die

Leberzelle nach ANIT-Gabe morphologisch wenig geschädigt. Der HB-Metabolismus ist nach Untersuchungen von BRACHTEL u. Mitarb. (2) quantitativ nicht beeinträchtigt. Demgegenüber ist die biliäre Indocyaningrün-Elimination fast völlig unterdrückt (33). Die Bromsulphthalein-Ausscheidung ist stärker eingeschränkt, als der Gallefluß (6). ANIT-Tiere können Bilirubin noch konjugieren, dann aber nicht mehr sezernieren (34). Die Schädigung durch ANIT scheint eher Transportvorgänge als die Metabolisierung in der Leberzelle zu betreffen. Wir fanden bei einer geringgradigen Einschränkung des Galleflusses auf die Hälfte an polaren Metaboliten in der Galle nur noch ca. 1 % der Norm, während unpolare Metabolite nur auf ein Viertel eingeschränkt waren. Im Urin wurden bei insgesamt nicht veränderter Ausscheidung vermehrt polare Metabolite ausgeschieden. Zieht man die kurze Versuchsdauer in Erwägung, kann man annehmen, daß die Ausschleusung des polaren Metaboliten in die Galle ziemlich selektiv beeinträchtigt war, wogegen die Metabolisierung wenig gestört erscheint.

Bemerkenswert ist die enge Korrelation zwischen Gallefluß und der Metabolit-Ausscheidung in der ANIT-Gruppe, die in der Kontrollgruppe nicht nachzuweisen ist (Abb. 11). Die pathologischen Veränderungen durch ANIT verknüpfen diese beiden Parameter, die beim gesunden Tier unabhängig voneinander sind. Die hohe Korrelation der Gesamtmetabolitausscheidung mit der Gallesekretion kommt hierbei über die streng galleflußabhängige Ausscheidung der unpolaren Metaboliten zustande. Wenn auch ANIT hauptsächlich eine Störung von Transportvorgängen hervorzurufen scheint, muß die Lokalisation des Schadens offen bleiben. Nach den Erstbeschreibern der ANIT-Cholestase (12,29) tritt eine intrahepatische Obstruktion durch eine Cholangiolitis auf. SCHAFFNER (44) stellte fest, daß bei ANIT-Cholestase die Bildung von dihydroxylierten Gallensäuren vermindert sein soll. POPPER und SCHAFFNER (36) bringen die Hypertrophie des glatten endoplasmatischen Retikulums mit einer Fehlsteuerung der Produktion von Gallensäuremicellen in Beziehung und vermuten darin die Ursache der ANIT-Cholestase. Zusammen mit der Theorie des Micellar Sink

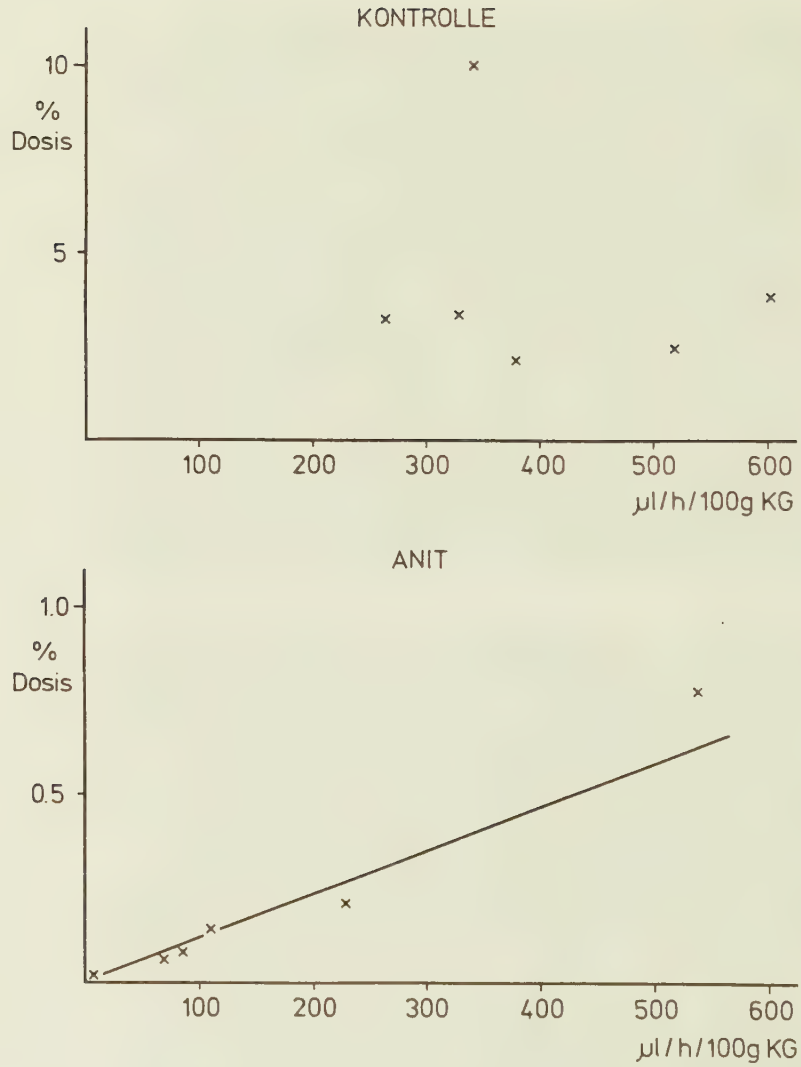

Abb. 11 Beziehung zwischen Gallefluss und ^{14}C-HB-Metabolit-Ausscheidung bei Tieren mit ANIT-Cholestase im Vergleich zum Kontrollkollektiv.

von SCHARSCHMIDT und SCHMID (45), wonach Gallensäurenmicellen Transportvehikel für organische Anionen darstellen,wird diese Hypothese wahrscheinlicher.

Ein weiterer Angriffspunkt könnte in einer Veränderung der Gallengangsmembranen liegen. KAKIS und YOUSEF fanden nach Lithocholsäureinfusion eine Anhebung des Cholesterol/Phospholipidverhältnisses in den Membranen der Canaliculi, wodurch die Wasserpermeabilität herabgesetzt wird (26).

Demgegenüber scheint dem Serumbilirubinspiegel nicht die entscheidende Bedeutung zuzukommen. HUNTON (22,23) zeigt, daß die Elimination von Indocyaningrün bei ANIT-Cholestase abhängig vom Serumbilirubinspiegel ist. Bilirubin und Indocyaningrün hemmen kompetitiv die Ausscheidung in die Galle (33,59). Nach den hier vorgelegten Befunden ist schon eine beginnende ANIT-Cholestase mit nur gering über der Norm liegenden Bilirubinspiegel in der Lage, Transportvorgänge empfindlich zu stören.

Unsere Ergebnisse sind nicht dazu geeignet, den Ort der Läsion aufzuzeigen, wohl deuten sie eher auf eine Schädigung der Transportvorgänge durch ANIT hin, als auf eine Beeinträchtigung des Metabolismus.

Beachtung verdient auch die Frage, ob die Ausscheidung von polaren HB-Metaboliten im Urin als physiologischer Kompensationsmechanismus aufgefaßt werden soll, oder ob es sich hier um einen Vorgang handelt, der möglicherweise geeignet ist, die Nierenfunktion zu beeinträchtigen. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, daß es in der Folge einer Leberinsuffizienz zu einem Nierenversagen kommen kann, möglicherweise durch eine Überlastung der Niere durch Stoffwechselprodukte auf deren Ausscheidung sie nicht eingestellt ist.

Keine der hier angebotenen Erklärungen und Hypothesen kann durch die durchgeführten Versuche bewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen

jedoch, daß das Eliminationssystem der Leber empfindlich schon auf geringgradige Störungen reagiert, die mit klinischen Parametern kaum nachweisbar sind.

Um den Hintergrund dieser Vorgänge aufzuklären, sind tiefergehende Untersuchungen notwendig.

VIII ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß der ANIT-Cholestase auf die Ausscheidung von ^{14}C-Hexobarbital-Metaboliten in Galle und Urin bei Ratten untersucht werden.

Als Kontrollgruppen dienten unbehandelte und phenobarbitalvorbehandelte Tiere.

Die Tiere der Kontrollgruppe scheiden in der Galle polare und unpolare HB-Metaboliten im Verhältnis 4:1 aus. Im Urin finden sich im wesentlichen nur unpolare Metaboliten.

Bei sechs Ratten ist der Gallefluß 12 Std. nach oraler Applikation von 100 mg/kg KG ANIT auf die Hälfte und die HB-Metabolitausscheidung auf ein Viertel reduziert. In der Galle findet sich praktisch keine polaren Metabolite mehr, dafür beträgt der Anteil der polaren Fraktion im Urin mehr als 25 %.

Die polaren Metabolite können durch Säurehydrolyse und Behandlung mit 50 % Äthanol zum Teil in Substanzen mit den dünnschichtchromatographischen Eigenschaften von 3'-Keto-HB überführt werden.

Die durch ANIT hervorgerufene Schädigung betrifft daher wohl eher das Transportsystem der Leberzelle, wogegen das arzneimittelabbauende Enzymsystem weniger beeinträchtigt erscheint.

IX LITERATURVERZEICHNIS

1. ADACHI, Y., YAMAMOTO, T.:
Influence of drugs and chemicals upon hepatic enzymes and proteins. I. Structure-activity relationship between various barbiturates and microsomal enzyme induction in rat liver.
Biochem. Pharmacol. 25, 663-668 (1976)

2. BRACHTEL, D., GALLENKAMP, H., RICHTER, E.:
Hexobarbital-Oxidation in vivo und in vitro bei Choledochus-ligatur und bei ANIT-Cholestase der Ratte.
Z. Gastroenterol. 15, 378-380 (1977)

3. BREIMER, D., ZILLY, W., RICHTER, E.:
Pharmacokinetics of hexobarbital in acute hepatitis and after apparent recovery.
Clin. Pharmacol. 18, 433-440 (1975)

4. BUSH, M.T., WELLER, W.:
Metabolic fate of hexobarbital (HB).
Drug Met. Reviews 1, 249-290 (1972)

5. CHRISTENSEN, F.:
Metabolism of dicoumarol by liver microsomes from untreated and phenobarbital treated rats.
Biochem. Pharmacol. 21, 2303-2311 (1972)

6. CLODI, P.H., STEFENELLI, N.:
Gallenfluß, Gallendruck und Bromsulphthalein-Ausscheidung bei der experimentellen intrahepatischen Cholestase der Ratte.
Z. ges. exp. Med. 142, 1-8 (1967)

7. DREW, R., PRIESTLY, B.G.:
Hexobarbital sleeping time and drug metabolism in rats with ligated bile ducts - a lack of correlation.
Biochemm. Pharmacol. 25, 1659-1663 (1976)

8. DREW, R., PRIESTLY, B.G.:
Microsomal drug metabolism during α-naphtylisothiocyanate-induced cholestasis.
Tox. appl. Pharmacol. 35, 491-499 (1976)

9. DREW, R., PRIESTLY, B.G., OREILLY, W.J.:
Hexobarbital pharmakokinetic in rats after ligation of the common bile duct.
J. Pharmacol. exp. Therap. 201, 534-540 (1977)

10. EL-HAWARI, A.M., PLAA, G.L.:
α -Naphtylisothiocyanate (ANIT) hepatotoxicity and irreversible binding to rat liver microsomes.
Biochem. Pharmacol. 26, 1857-1866 (1977)

11. EL-HAWARI, A.M., PLAA, G.L.:
Role of the enterohepatic circulation in the elimination of phenytoin in the rat.
Drug. Met. Dispos. 6, 59-70 (1978)

12. ELIAKIM, M., EISNER, M., UNGAR, H.:
Experimental intrahepatic obstructive jaundice following ingestion of α -naphtylisothiocyanate.
Bull. Res. Counc. of Israel 8 E 7-17 (1959)

13. GALLEAZZI, R., JAVITT, N.B.:
Bile acid excretion: The alternate pathway in the Hamster.
J. Clin. Invest. 60, 693-701 (1977)

14. GERBER, W., LYNN, R., HOLCOMB, R., WELLER, W.L., BUSH, M.T.:
The metabolism of hexobarbital in mice and methodology for isolation and quantitation of its metabolites in vivo and in vitro.
J. Pharmacol. exp. Therap. 177, 234-245 (1971)

15. GLAZER, R.J., SARTORELLI, A.C.:
The effect of phenobarbital on the synthesis of nascent protein in free and membrane-bound polyribosomes of normal and regenerating liver.
Mol. Pharm. 8, 701-710 (1972)

16. GOLDFARB, S., SINGER, E.J., POPPER, H.:
Experimental cholangitis due to α-Naphtylisothiocyanate (ANIT).
Am. J. Phatol. 40, 685-694 (1962)

17. GREIM, H., SCHENKMANN, J.B., KLOTZBÜCHER, M., REMMER, H.:
The influence of phenobarbital on the turnover of hepatic microsomal cytochrome b_5 and cytochrome P-450 hemes in the rat.
Biochem. Biophys. Acta 201, 20-25 (1970)

18. GREIM, H., TROLZSCH, D., ROBOZ, J., DRESSLER, K., CZYGAN, P., HUTTERER, F., SCHAFFNER, F., POPPER, H.:
Mechanism of cholestasis, 5. Bile acids in normal rat livers and in those after bile duct ligation.
Gastroenterol. 63, 837-845 (1972)

19. HABIG, W.H., PABST, M.J., FLEISCHNER, G., GATMAITAN, Z., ARIAS, I.M., JAKOBY, W.B.:
The identity of glutathione S-transferase B with Ligandin a major binding protein of liver.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3879-3882 (1974)

20. HEYNEN, H.U.:
Metabolit-Ausscheidung im Harn nach oraler Gabe von ^{3}H-Hexobarbital und ^{3}H-Paracetamol bei Ratten mit ANIT-Cholestase.
Inaug. Diss. Würzburg (1978)

21. HOLCOMB, R., GERBER, N., BUSH, M.:
The metabolic fate of hexobarbital in the rat.
J. Pharmacol. exp. Therap. 188, 15-26 (1974)

22. HUNTON, D.B., BOLLMANN, J.L., HOFFMAN, H.N.:
Studies of hepatic function with indocyanine green.
Gastroenterol. 39, 713-723 (1960)

23. HUNTON, D.B., BOLLMANN, J.L., HOFFMAN, H.N.:
The plasma removal of indocyanine green and sulfobromphtalein: effect of dosage and blocking agents.
J. clin. Invest. 40, 1648-1655 (1961)

24. HUTTERER, F., DENK, H., BACCHIN, P.G., SCHENKMAN, J.B., SCHAFFNER, F., POPPER, H.:
Mechanism of cholestasis. 1. Effect of Bile acids on microsomal cytochrome P-450 dependent bio-transformation system in vitro.
Life Sciences 9, 877-887 (1970)

25. IGA, T., SUGIYAMA, Y., YOKOTA, M., TOMONO, Y., AWAZU, S., HANANO, M.:
Pharmacokinetic aspects of sulfobromphtalein transport in chronically carbon tetrachloride intoxicated rats.
Biochem. Pharmacol. 26, 1867-1875 (1977)

26. KAKIS, G., YOUSEF, I.M.:
Pathogenesis of lithocholate - and taurolithocholate - induced intrahepatic cholestasis in rats.
Gaatroenterol. 75, 595-607 (1978)

27. MACKINNON, A.M., SUTHERLAND, E., SIMON, F.R.:
Qualitativ alteration in hepatic microsomal cytochrom p-450 apoproteins associated with bile duct ligation and the administration of ethinylestradiol, phenobarbital and 3-methylcholanthrene.
Biochem. Pharmacol. 27, 29-35 (1978)

28. MARTIN, J.F., VIERLING, J.M., WOLKOFF, A.W., SCHARSCHMIDT, B.F., VERGALLA, J., WAGGONER, J.G., BERK, P.D.:
Abnormal hepatic transport of indocyanine green in Gilbert's syndrom.
Gastroenterol. 70, 385-391 (1976)

29. MCLEAN, M.,R., REES, K.R.:
Hyperplasia of bile ducts induced by α-naphtylisothiocyanate: experimental biliary cirrhosis free from biliary obstruction.
J. Path. Bact. 76, 175-187 (1958)

30. MILLBURN, P.:
Excretion of xenobiotic compounds in bile.
In: The hepatobiliary system. Fundamental and pathological mechanism.
(Ed. W. Taylor) pp. 109, New York Plenum Press (1976)

31. PALMER, R.H.:
The formation of bile acids sulphates: a new pathway of bile acid metabolism in humans.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 1047 (1967)

32. PAULINI, K., SCHRIEFERS, H., OCKENFELS, H., BENEKE, G.:
Proteinbestand und Aktivität mikrosomaler Enzyme der Leber von Ratten verschiedener Altersstufen unter der Behandlung mit Phenobarbital.
Beitr. Path. 147, 366-378 (1972)

33. PAUMGARTNER, G.:
The handling of indocyanine green by the liver.
Schweiz. med. Wschr. Suppl. (1975)

34. PLAA, G.L.:
Functional aspects of the cholestatic response induced by ANIT in mice and rats.
Agents and Actions 1, 22-27 (1969)

35. PLATT, D., SCHNORR, B.:
Ultrastrukturelle Veränderungen der Rattenleber nach Gabe von 1-Naphtylisothiocyanat (ANIT)
Acta hepato-gastroenterol. 19, 356-361 (1972)

36. POPPER, H., SCHAFFNER, F.:
Pathophysiology of cholestasis.
Human Pathology 1, 1-24 (1970)

37. REINKE, L.A., O'CONNOR, M.F., PIEPHO, R.W., STOHS, S.J.:
A comparison of the inductive effects of phenobarbital, methaqualone and methyprylone on hepatic mixed function oxidase enzymes in the rat.
Res. comm. chem. path. pharmacol. 11, 45-53 (1975)

38. REYES, H., LEVI, A.J.; GATMAITAN, Z., ARIAS, J.M:
Studies of Y and Z, two hepatic cytoplasmic organic anion-binding proteins: effect of drugs, chemicals, hormones and cholestasis.
J. clin. Invest. 50, 2242-2252 (1971)

39. RICHTER, E., GRON, M., KOHN, H.A.:
Proteinsynthese und Ikterus bei der ANIT-Cholestase der Ratte.
Verh. dtsch. Ges. Inn. Med. 75, 367-369 (1969)

40. RICHTER, E., ZILLY, W., BRACHTEL, D., GALLENKAMP, H.:
Arzneimittelmetabolismus bei Lebererkrankungen.
Perimed 1, 20-23 (1977)

41. ROBERTS, R.J., PLAA, G.L.:
Potentiation and inhibition of α -naphtylisothiocyanate-induced hyperbilirubinemia and cholestasis.
J. Pharmacol. exp. Ther. 150, 499-506 (1965)

42. ROBERTS, R.J., PLAA, G.L.:
Alteration of the plasma disappearance and biliary excretion patterns of exogenously administered bilirubin by α -naphtyl-isothiocyanate.
J. Pharmacol. exp. Ther. 155, 330-336 (1967)

43. ROERIG, D., HASEGAWA, A.T., WANG, R.I.:
Effect of phenobarbital pretreatment on the metabolism and biliary excretion of methadone.
Biochem. Pharmacol. 24, 355-362 (1975)

44. SCHAFFNER, H., SCHARNBECK, H., HUTTERER, F., DENK, H., GREIM, H.A., POPPER, H.:
Mechanism of cholestasis: VII. α -naphtylisothiocyanate induced jaundice.
Lab. Invest. 28, 321-331 (1973)

45. SCHARSCHMIDT, B.F., SCHMID, R.:
The micellar sink.
A quantitative assessment of the association of organic anions with mixed micelles and other macromolecular aggregates in rat bile.
J. clin. Invest. 62, 1122-1131 (1978)

46. SCHARSCHMIDT, B.F., WAGGONER, J.G., BERK, P.D.:
Hepatic organic anion uptake in the rat.
J. clin. Invest. 56, 1280-1291 (1975)

47. SCHWENK, M., BURR, R., SCHWARZ, L., PFAFF, E.:
Uptake of bromosulfophthalein by isolated liver cells.
Eur. J. Biochem. 64, 189-197 (1976)

48. SIMON, F.R., SUTHERLAND, E., ACCATINO, L.:
Stimulation of hepatic sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase activity by phenobarbital.
J. clin. Invest. 59, 849-861 (1977)

49. SMALL, D.M., DOWLING, R.H., REDINGER, R.N.:
The enterohepatic circulation of bile salts.
Arch. intern. Med. 130, 552-573 (1972)

50. STRAMENTINOLI, G., GAZZANIGA, A., DELLABELLA, D., REMMER, H.:
Increase of chloramphenicol glucuronidation in rats treated with phenobarbital.
Biochem. Pharmacol. 23, 1181-1186 (1974)

51. TOKI, S., TAKENOUCHI, T.:
Hexobarbital metabolism. Formation of α-1,5-dimethyl-5-[3-hydroxy-1-cyclohexen-1-yl]-barbituric acid glucuronide.
Chem. Pharm. Bull. 13, 606-609 (1965)

52. TUMA, D.J., JENNETT, R.B., SORRELL, M.F.:
Impairment of glycoprotein secretion by phenobarbital in rat liver slices.
Biochem. biophys. Acta 544, 144-152 (1978)

53. UNGAR, H., POPP, J.A.:
Acute cholecystitis and persistent liver necrosis in mice provoked by Isothiocyanate.
Arch. Pathol. Lab. Med. 100, 127-131 (1976)

54. VAN BERGE HENEGOUWEN G.P.:
Bile acids and cholestasis.
Thesis, Nijmwegen, The Netherlands (1974)

55. VERMEULEN, N.P.E., BAKKER, B.H., SCHULTINK, J., VAN DER GEN, A., BREIMER, D.D.:
The epoxide-diol pathway in the metabolism of hexobarbital in rats and man.
Xenobiotica (in press) (1979)

56. VONK, R.J., JEKEL, P., MEIJER, D.K.F.:
Choleresis and hepatic transport mechanisms. II. Influence of bile salt choleresis and biliary micelle binding on biliary excretion of various organic anions.
Naunyn-Schmiedeberg's arch. Pharmacol. 290, 375-387 (1975)

57. VONK, R.J., JEKEL, P.A., MEIJER, D.K.F., HARDONK, M.J.:
Transport of drugs in isolated hepatocytes.
The influence of bile salts.
Biochem. Pharmacol. 27, 397-405 (1978)

58. WHELAN, G., COMBES, B.:
Phenobarbital-enhanced biliary excretion of administered unconjugated and conjugated sulfobromophthalein (BSP) in the rat.
Biochem. Pharmacol. 24, 1283-1286 (1975)

59. YEARY, R.A., WISE, K.J.:
Plasma disappearance of sulfobromophtalein or indocyanine green in unconjugated hyperbilirubinemia.
Res. Com. in Chem. Path. and Pharmacol. 12, 125-136 (1975)

Herrn Professor Dr. med. E. RICHTER danke ich für die Überlassung des Themas und für die großzügige Unterstützung bei der Bearbeitung.

Herrn Professor Dr. med. H. A. KOHN danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn cand. med. J. BUSCHMANN möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit danken.

LEBENSLAUF

Am 11. März 1954 wurde ich als erstes Kind des Kaufmanns Rolf Joeres und seiner Ehefrau Marianne, geb. Brosch, in Mönchengladbach geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Wanne-Eickel und Bocholt, von 1964 bis 1972 das Gymnasium in Bocholt, Kleve und zuletzt Coburg, wo ich am 23. Juni 1972 die Reifeprüfung bestand.

Im Herbst 1972 trat ich in die Bundeswehr ein und schied Ende 1974 als Leutnant der Reserve aus dem Dienst aus.

Im Wintersemester 1974/75 nahm ich das Studium der Medizin an der Universität Würzburg auf. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Sommer 1976, den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Sommer 1977 und den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Sommer 1979. Das Abschlußexamen legte ich im Oktober 1980 ab.

Rolf Peter Joeres

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80